Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke im Kopfklinikum Würzburg
Direktor : Professor Dr. med. W. Kley

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRACHEALERSATZ DURCH HOMOLOGE SEGMENTIMPLANTATE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Joachim Dodenhöft
aus Würzburg

Würzburg, 6. März 1981

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke im Kopfklinikum Würzburg
Direktor : Professor Dr. med. W. Kley

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRACHEALERSATZ DURCH HOMOLOGE SEGMENTIMPLANTATE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Joachim Dodenhöft
aus Würzburg

Würzburg, 6. März 1981

Referent: Privatdozent Dr. Dr. med. habil. K. Foet

Korreferent: Professor Dr. med. W. Kley

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 9.12.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Anatomie der Trachea	3
3.	Material und Methode	5
3.1.	Versuchstiere	5
3.2.	Instrumentarium und Vorbereitung zur Operation	6
3.3.	Anästhesie	6
3.4.	Gewinnung der Implantate	8
3.5.	Konservierungsverfahren	8
3.6.	Operatives Vorgehen	13
3.7.	Histologische Aufarbeitung und Färbungen	16
3.8.	Fluoreszenzmikroskopie	19
3.9.	Vitalfärbung mit Neutralrot	23
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Direkte Implantation	26
4.1.1.	Makroskopische Beurteilung	26
4.1.2.	Mikroskopische Beurteilung	27
4.2.	Implantation nach vorausgegangener paratrachealer Implantation	55
4.2.1.	Makroskopische Beurteilung	55
4.2.2.	Mikroskopische Beurteilung	61
4.3.	Zusammenfassung der Befunde	75
5.	Diskussion	78
6.	Zusammenfassung und Ausblick	84
7.	Literaturübersicht	88

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0030

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Operative Eingriffe an der Trachea wurden schon gegen Ende des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Das eigentliche Interesse an der Trachealchirurgie entstand jedoch erst in den letzten 25 Jahren, wie an zahlreichen klinischen und experimentellen Publikationen in diesem Zeitraum zu ersehen ist (ALONSO et al., BANFAI, BRANDT, BRYCE, FLEMMING, GOLLMITZ, GREENBERG, GRILLO, v.ILBERG, KAPUR, KORNMESSER, KUP, LESOINE, MICHELSON et al., MORITZ, RÉVÉSZ, ROB, SCHLOSSHAUER, SELLING et al., TOOHILL, WILKE). Dieses Interesse korreliert vor allem mit der Zunahme behandlungsbedürftiger Trachealstenosen.

Das Auftreten von Trachealstenosen nach chirurgischen Eingriffen, Infektionen oder nach Traumen stellt zwar kein neues Problem dar, doch mit dem Auftreten der Überdruckbeatmung und der blockbaren Trachealtuben, insbesondere im Verlauf der Langzeitintubation auf Intensivstationen und in Reanimationszentren hat dieses Problem an Häufigkeit und Bedeutung erheblich zugenommen (ATKINS, BIRKE u. BIRKE, GIBSON, v.ILBERG u. KITANO, NORDIN).

Die chirurgische Behandlung von Trachealstenosen, die sich über mehrere Segmente erstrecken, stellt bisweilen den Operateur hinsichtlich der Wahl der geeigneten Methode vor schwere Entscheidungen.

So ist gerade zur Behandlung ausgedehnter Stenosen die Frage nach einem geeigneten Trachealersatz in der Chirurgie der Trachea immer Gegenstand experimenteller Untersuchungen gewesen. Zahlreiche Autoren beschreiben die Verwendung von alloplastischem Material als Tracheal- und Bronchialersatz (CHENG, TAKAYI, AKUTSU ; BORRIE, REDSHAW ; SELING, KONRAD, BERNDT ; BORRIE, REDSHAW, DOBBINSON ; MORITZ). MORITZ kam zu den Ergebnissen, daß mit flexiblen Silastic-Prothesen bis zu 12 cm des fehlenden Atemrohrs er-

setzt werden können. Als Nachteile beschreibt er das fehlende Einwachsen von Flimmerepithel, die Komplikationsgefahren durch Nahtinsuffizienz und Sepsis und die Gefahr der Aspirationspneumonie. v.ILBERG, KITANO u. SCHMIDT sowie WEIDAUER u. ARNOLD haben tierexperimentelle Untersuchungen mit der Implantation homologer in Cialit konservierter Knorpelteile zur Wiederherstellung von Trachealdefekten durchgeführt. Die Versuche an Hunden bzw. Kaninchen zeigten, daß der Knorpel nach einiger Zeit durch Bindegewebe ersetzt wird und Flimmerepithel über den Implantatbereich wächst.

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sollen unsere Ergebnisse zum Trachealersatz durch komplette homologe in Cialit konservierte Segmentimplantate mitgeteilt werden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll daher sein, das biologische Verhalten des implantierten Knorpels in juvenilen und adulten Empfängertieren, die Schleimhautregeneration sowie die Frage nach möglichen Stenosierungen des Tracheallumens zu untersuchen.

Insbesondere soll die von einigen Autoren (v.ILBERG, WEIDAUER) diskutierte Frage der Revitalisierung homologer Knorpelimplantate sowie die Frage nach der klinischen Anwendbarkeit einer kritischen Analyse unterzogen werden.

Zu diesem Zweck wurde in einem Tierkollektiv die direkte Implantation der Segmente in die Trachea vorgenommen und bei einem zweiten Kollektiv erst nach einer Vorimplantation in das paratracheale Gewebe.

2. ANATOMIE DER TRACHEA

Dicht unter der Halshaut finden sich bei der Ratte sehr stark entwickelte Glandulae submandibulares, die durch lockeres Bindegewebe miteinander verbunden sind. Unmittelbar dorsal und kaudal dieser Speicheldrüse liegt die gerade Halsmuskulatur, welche die Trachea scheidenförmig einhüllt. Die Schilddrüse liegt dem Schildknorpel und den beiden obersten Trachealsegmenten unmittelbar auf. Die Trachea wird arteriell von arkadenförmigen Ästen einer Anastomose zwischen der Arteria thyreoidea caudalis und der Arteria bronchialis versorgt, welche den Membranae intercartilagineae benachbart sind. Der venöse Abfluß erfolgt über gleichsinnig gebaute Venolen. Die gut erkennbaren Nervi recurrentes verlaufen unmittelbar lateral gemeinsam mit den Gefäßen (Abb. 1).

Die Luftröhre besteht aus 18 - 22 hufeisenförmigen hyalinen Knorpelspangen (im Vergleich dazu besitzt die menschliche Trachea 16 - 20 Knorpelspangen). Die Knorpel werden dorsal gegen den Ösophagus von Bindegewebe und glatten Muskelfasern zu einem Ring geschlossen. Dieser dorsale bindegewebige und muskuläre Abschluß heißt paries membranaceus. Die Muskulatur ermöglicht Enger- und Weitstellung des Atemrohrs. Die Knorpelspangen werden untereinander durch eine mit dem Perichondrium zusammenhängenden Faserhaut verbunden, deren Segmente man als Membranae intercartilagineae bezeichnet. Die Lichtung der Trachea wird von Schleimhaut ausgekleidet, die aus mehrreihigem, Becherzellen enthaltendem Flimmerepithel und der Lamina propria besteht. Ein lockeres Bindegewebe umschließt als Adventitia die Oberfläche der Luftröhre. Der Knorpel selbst wird von einem äußeren und einem inneren Perichondrium umgeben.

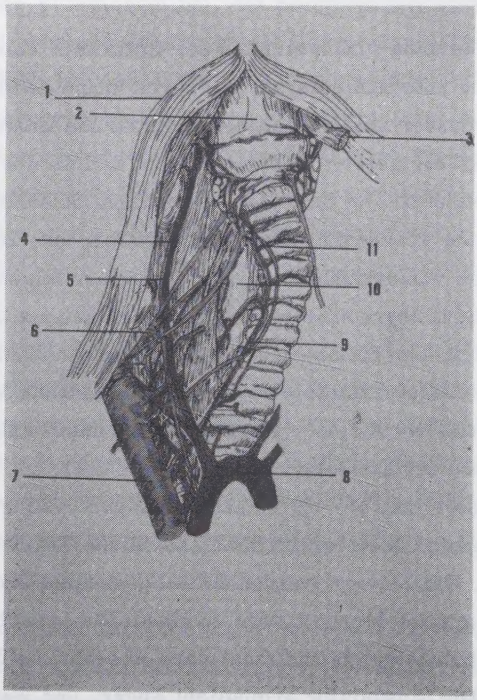


Abb. 1 : Anatomische Verhältnisse :

1 = M. sternohyoideus
2 = Larynx
3 = M. Sternothyreoideus
4 = A. carotis communis
5 = N. vagus
6 = V. jugularis interna
7 = V. cava superior
8 = Truncus aortae
9 = A. thyreoidea caudalis
10 = Oesophagus
11 = N. recurrens

In Anlehnung an GREENE, E.: Anatomy of the Rat, Hafner Publishing Co., New York (1955)

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstier diente ein Nager, die Albinoratte vom Inzuchtsstamm WISTAR. Die Ratte erschien als günstiges Versuchstier, da sie in der Pflege wenig Probleme aufwirft, ein relativ schnell wachsendes Tier darstellt und zahlenmäßig ohne Beschränkung zur Verfügung stand.
Die Tiere entstammten einer eigenen Nachzucht von Tieren des Zentralinstituts für Versuchstierzucht in Hannover. Das Geschlecht blieb ohne Berücksichtigung.
Die Versuchstiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten. Die Raumtemperatur von 24°C und die Luftfeuchtigkeit von 50 % wurden konstant eingehalten. Zuchtdiät Altromin 1310 und Wasser ad libitum standen den Tieren während der Versuche zur Verfügung. Die neugeborenen Tiere wurden nach Beendigung der Operation bis zum Nachlassen der Narkosewirkung noch zusätzlich einer Infrarotlampe ausgesetzt, um ein zu starkes Auskühlen des Körpers zu verhindern.

Zur Implantatgewinnung wurden Spendertiere, die gewichtsmäßig den Empfängertieren entsprachen, getötet und drei Trachealringe zusammenhängend entnommen.
In die Versuche gingen insgesamt 55 Tiere ein. Es wurden zwei Kollektive von 33 und 22 Tieren gebildet.
Das erste Kollektiv bestand aus zwei Altersgruppen mit 24 adulten Tieren im Alter von 3-4 Monaten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 230 g und 9 juvenilen Tieren im Alter von 4 1/2 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 45 g. Diesen Tieren wurden drei zusammenhängende in Cialit konservierte homologe Trachealringe direkt implantiert.
Das zweite Kollektiv bestand ebenfalls aus zwei Altersgruppen mit 10 adulten und 12 juvenilen Tieren im Alter von 3 Monaten bzw.

1 Woche mit einem durchschnittlichen Gewicht von 210 g bzw. 30 g. Diesem Kollektiv wurden drei zusammenhängende in Cialit konservierte homologe Trachealsegmente vor der eigentlichen Implantation in die Trachea des Empfängertieres für die Dauer von 5 Wochen in das paratracheale Gewebe vorimplantiert.

3.2. Instrumentarium und Vorbereitung zur Operation

Bei der Operation wurden geläufige Instrumente aus der Mikrochirurgie des Ohres verwendet (Abb. 2). Zur Naht der Trachealringe wurde atraumatisches Nahtmaterial der Stärke 7-0 Chromcat der Firma Ethicon und zur Hautnaht atraumatisches 3-0 Chromcat benutzt.
Nach Rasur und Reinigung der Halshaut von Haaren wurde das Operationsgebiet mit Kodanspray desinfiziert. Die Tiere wurden in Rückenlage, den Kopf zum Operateur gerichtet, mit Nadeln auf einer Korkplatte fixiert (Abb. 3). Die Korkplatten waren mit einem sterilen Operationstuch bede ckt. Das gesamte Operationsinstrumentarium wurde vor der Operation sterilisiert.
Die Eingriffe wurden unter Benutzung eines Operationsmikroskops der Firma Carl Zeiss durchgeführt. Daran angeschlossen war eine Kamera der Firma Zeiss-Ikon, die mit einem Film der Marke "Kodak Ektachrome 200" bestückt wurde.

3.3. Anästhesie

Zur Narkose wurde Ketanest in der handelsüblichen Konzentration von 50 mg/ml intraperitoneal verabreicht. Wegen der vom Körpergewicht unabhängigen unterschiedlichen Toleranzbreite der beiden Altersstufen wurde die Konzentration des Anästhetikums auf das je-

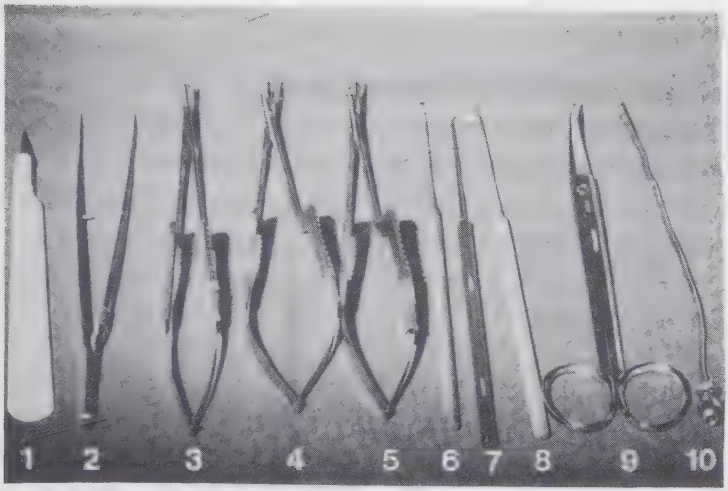


Abb. 2 : Operationsinstrumentarium :

1 = Einmalskalpell
2 = Anatomische Pinzette
3 = Mikro-Schere nach Buck-Gramcko
4 = Knüpf-Pinzette nach Buck-Gramcko
5 = Mikro-Nadelhalter nach Buck-Gramcko
6 + 7 = Tellermesser
8 = Sichelmesser
9 = Präparierschere
10 = Silbersauger

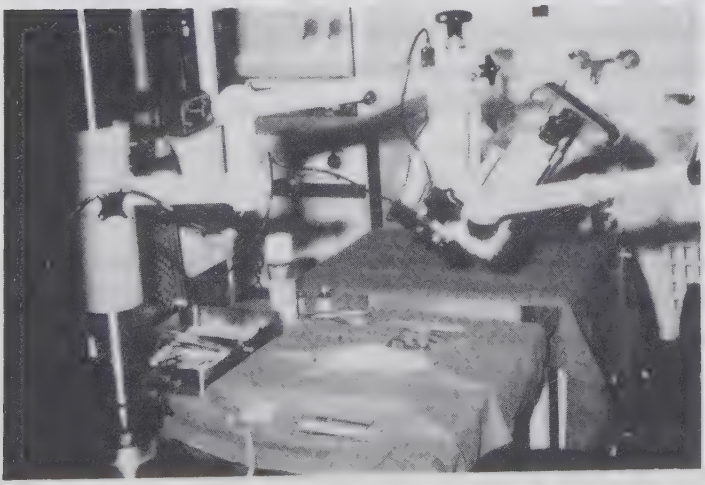


Abb. 3 : Arbeitsplatzanordnung

weilige Alter der Versuchstiere abgestimmt. Um eine ausreichend tiefe Narkose bis 30 min. Dauer zu erzielen, wurden den Jungtieren 0,1 ml und den ausgewachsenen Tieren durchschnittlich 0,65 ml Ketanest (50 mg/ml) gespritzt. Bei Bedarf konnte die Dauer durch Nachinjektion beliebig verlängert werden. Die neugeborenen Tiere, die erst eine Woche alt waren, wurden in einem zylindrischen Glas mit Äther narkotisiert.

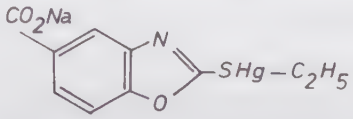
3.4. Gewinnung der Implantate

Als Spendertiere dienten insgesamt 13 adulte Ratten im Alter von drei Monaten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 260 g und 10 juvenile Ratten im Alter von fünf Wochen mit einem Durchschnittsgewicht von 50 g.
Die Tiere wurden mit einer Überdosis Ketanest getötet, die vordere Halsregion durch einen medianen Längsschnitt eröffnet und die Trachea freigelegt.
Unter dem Mikroskop wurden drei Ringe zusammenhängend entnommen. Dabei wurden nur Ringe im Bereich des 3. bis 15. Trachealknorpels verwendet, um möglichst genau der Ringform im Transplantatbereich zu entsprechen.
Nach Freipräparierung der Knorpelringe wurden sie anschließend in 3,1 %ige Formalinlösung gelegt.

3.5. Konservierungsverfahren

Ziel einer Vorbehandlung mit Konservierungsstoffen ist die Haltbarmachung von Geweben. Hierbei sind zwei Vorgänge von Bedeutung. Einmal eine Verhütung der Autolyse durch Inaktivierung oder Blockierung der Enzymaktivität (= Konservierung) und zum anderen eine Gewährleistung der Keimfreiheit (= Sterilisierung).

Für die Konservierung der Implantate wurde Cialit verwendet.



2 (acethyl-mercuri-mercapto)-benzoaxol-5 carbonsaures Na

CIALIT

Cialit ist eine organische Quecksilberverbindung, die von HAUBERG und BRUCKSCHEN (1954) für die Gewebekonservierung in einer Verdünnung von 1 : 5 000 empfohlen wurde. Es hat das von O' CONNOR und PIERCE (1938) eingeführte chemisch ähnliche Merthiolat heute weitgehend verdrängt, da es beständiger ist und geringere Gewebereaktionen auslöst.

Die Konservierung mit Cialit wird schon längere Zeit erfolgreich bei der Übertragung von Gehörknöchelchen angewendet (STEINBACH u. WEBER, EITSCHBERGER et al.). KRÜGER beschreibt die Methoden der Konservierung, die Möglichkeiten der Transplantation und die Färbemethoden von Knorpelgewebe im allgemeinen. Mit immunologischen Fragen bei der Gewebekonservierung mit Cialit beschäftigten sich KASTENBAUER sowie KASTENBAUER u. HOCHSTRASSER. Sie kamen zum Ergebnis, daß die Löslichkeit der Proteine in diesen Geweben stark reduziert wird, woraus eine Verzögerung der Antigenfreisetzung resultiert und somit ein reizloseres Einheilen gewährleistet ist. Untersuchungen über cialitkonservierte Knorpelimplantationen in der Ohrchirurgie (WALLER et al., EITSCHBERGER et al.) und in der Nasenchirurgie (HELLMICH, EITSCHBERGER et al.) liegen bereits zahlreich in der Literatur vor, während Berichte in der Trachealchirurgie erst seit kurzer Zeit veröffentlicht wurden (v.ILBERG et al., WEIDAUER u. ARNOLD).

In Anlehnung an die Methode von PERKINS (1970) wurde eine Vor-

fixierung in 3,1 %iger Formalinlösung, die auf einen pH von 5,6 gepuffert sein muß, durchgeführt.

11 Teile SØRENSEN Puffer
(KH_2PO_4 + Na_2HPO_4) 1/15 molar
+ 1 Teil Formaldehyd

3,1 %iges Formalin pH = 5,6

Hierdurch werden die Strukturen des konservierten Knorpels noch besser erhalten.
Die gesamte Konservierung läuft nach dem folgenden Schema ab (s. auch MARQUET) :

1. 1 Tag in Formalin (3,1 %, pH 5,6)
2. 2 Tage in Cialit (1 : 5 000)
3. " " "
4. " " "
5. " " "
6. Vor Implantation 30-60 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung waschen.

Dabei sollten folgende Bedingungen eingehalten werden :

1. Die zeitlichen Angaben sind Minimalforderungen.
2. Rückführung des Cialit-konservierten Knorpels in Formalin, falls er nicht innerhalb von 8 Wochen zur Transplantation benötigt wurde.
3. Steriles Vorgehen beim Umbetten des Gewebes in die einzelnen Cialitbäder.

Die Aufbewahrung erfolgt bei + $3^{o}C$ im Kühlschrank.

Die günstige Qualität der Cialitkonservierung mit Formolvorfixierung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Selbst nach fünfmonatiger Konservierungsdauer waren sämtliche Strukturen noch so gut erhalten, daß sich sowohl Erythrocyten in den Kapillaren als auch Flimmerhaare des Flimmerepithels darstellen ließen (Abb. 4,5,6).

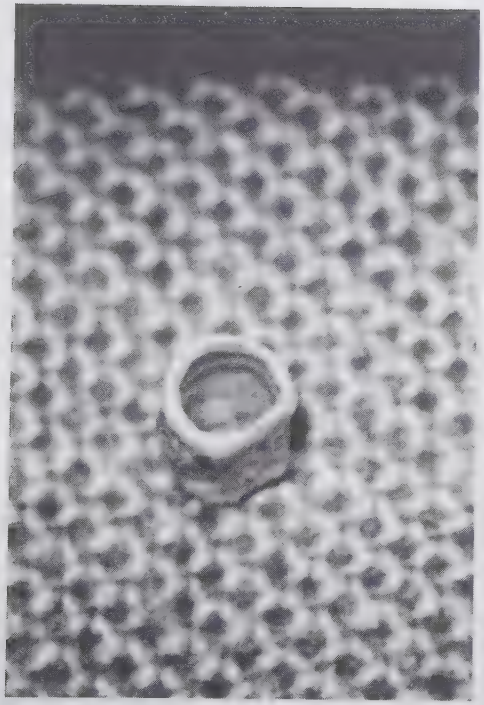


Abb. 4 : Implantat eines adulten Tieres nach Cialitkonservierung mit Formolvorfixierung

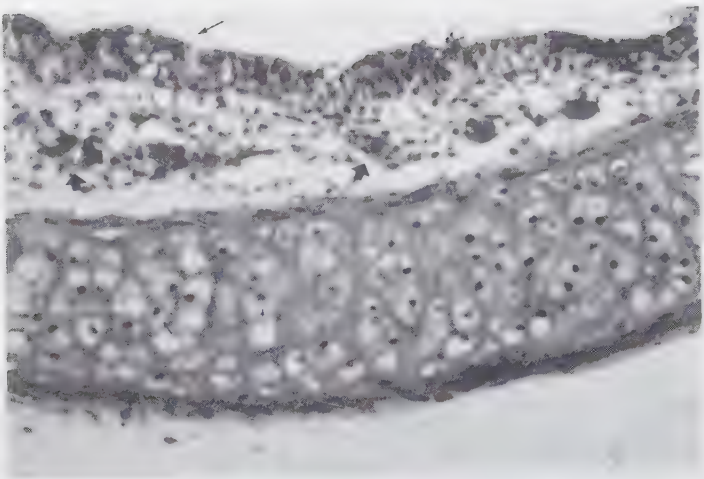


Abb. 5 : Trachealknorpel eines Jungtieres nach Cialitkonservierung mit Formolvorfixierung. Flimmerepithel (→), Erythrocyten in den Kapillaren (➡), Vitalität vortäuschende Darstellung der Kernstrukturen (→) ; Tri-PAS, 288-fach

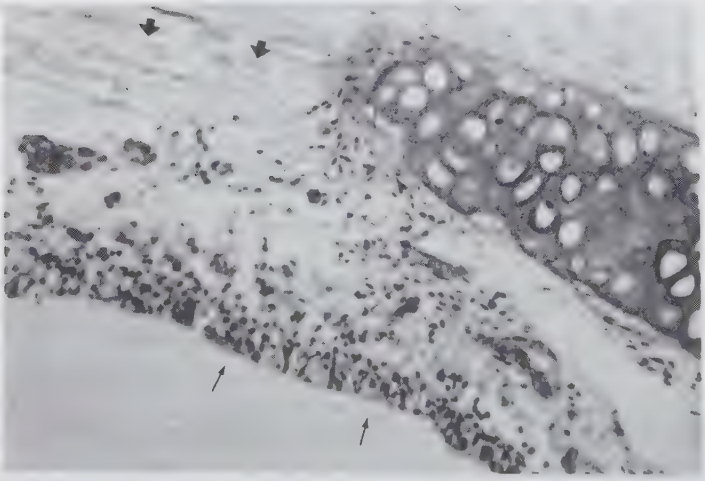


Abb. 6 : Trachealknorpel eines adulten Tieres nach Cialitkonservierung mit Formolvorfixierung. Flimmerhaare (→), paries membranaceus (➡) ; Tri-PAS, 225-fach

3.6. Operatives Vorgehen

Die Operation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nachdem das Tier auf eine Korkplatte fixiert war, wurde die Halsregion rasiert und mit Kodan-Spray desinfiziert. Es erfolgte die Eröffnung durch einen medianen Längsschnitt vom Ringknorpel des Kehlkopfes bis zum Brustbein. Die Faszie wurde durchtrennt, die Muskeln und die bei der Ratte stark entwickelte glandula submandibularis zur Seite gelagert, die prätracheale Muskulatur gespalten und lateral fixiert. Dann wurde die Trachea zwischen dem zweiten und dritten Ring durchtrennt und auf eine Länge von ca. 8 Ringen von der Unterlage abpräpariert, unter Schonung der Schilddrüsenarterie. Nach Resektion von 3 Trachealsegmenten wurde das Implantat eingepaßt und unter dem Mikroskop mit Chromcat 7 - 0 zirkulär eingenäht. Dabei wurden je nach Möglichkeit bei den adulten Tieren 3 Nähte auf die Circumferenz verteilt an jeder Anastomosenstelle angebracht und bei den juvenilen Tieren wegen der sehr kleinen Verhältnisse nur 2 Nähte pro Anastomosenstelle auf der viszeralen Seite. Im Anschluß erfolgte der schichtweise Wundverschluß mit Chromcat 3-0. Zur Infektionsminderung erhielten die Tiere frische Zellstoffeinlagen in die Käfige und Antibiotika ins Trinkwasser. Spätestens zwei Stunden nach der Operation waren die Tiere wieder wach.

Das operative Vorgehen beim zweiten Kollektiv unterschied sich dadurch, daß eine paratracheale Vorimplantation der eigentlichen Implantation vorausging. Es wurden den adulten Tieren der ersten Gruppe im Alter von zwei Monaten Implantate von drei Monate alten Ratten und den neugeborenen Jungtieren der zweiten Gruppe im Alter von einer Woche Trachealsegmente von sechs Wochen alten Tieren in ein paratracheales Implantatlager vorimplantiert.
Die Verweildauer der Implantate bei der paratrachealen Vorimplantation betrug fünf Wochen, so daß das Alter der Implantate zum Zeitpunkt der Implantation in die Trachea dem Alter der Empfängertiere

entsprach. Ziel der Vorimplantation in das paratracheale Gewebe war eine allseitige bindegewebige Umscheidung als Lager der einwachsenden Schleimhaut zu erreichen.
Dazu wurden die Tiere der ersten Gruppe mit Ketanest intraperitoneal narkotisiert, die Halsregion mit einem Medianschnitt eröffnet und paratracheal eine intramuskuläre Tasche gebildet. In diese wurde das Implantat gelegt. Um eine unkontrollierte bindegewebige Proliferation in das Lumen zu verhindern, wurde in dieses ein ca. 3 mm langer zurechtgeschnittener steriler Silikonblock eingebracht. Anschließend wurden Muskelschichten und Haut mit Chromcat 3-0 vernäht.
Die Tiere der zweiten Gruppe wurden mit Äther narkotisiert und in wie oben beschriebener Weise operiert. In diesem Fall wurde in das Lumen des Implantats ein ca. 2 mm langer steriler PVC-Schlauch der Größe 1 x 1,5 mm eingebracht. Beide Materialien sind als äußerst gewebefreundlich bekannt.

Der postoperative Verlauf der adulten Tiere des zweiten Kollektivs war unauffällig. Zum Zeitpunkt der eigentlichen Implantation waren alle Tiere drei Monate alt und wogen durchschnittlich 220 g, was dem Gewicht gleichalter, mitgewachsener und nicht operierter Tiere entsprach. Die Narkose erfolgte mit 0,65 ml Ketanest intraperitoneal. Durch einen medianen Längsschnitt wurde die Trachealregion freigelegt. Bei drei Tieren war jedoch kein Implantat paratracheal mehr auffindbar, so daß sieben Tiere zur Operation gelangten. Die Implantate lagen entzündungsfrei in der Muskeltasche und das Lumen war regelrecht durch das Silikonstück freigehalten worden. Reichlich Kapillaren und Bindegewebe umgaben den Knorpel sowohl außen als auch innen, zwischen Silikon und Knorpelinnenwand. Der Knorpel war makroskopisch völlig intakt, erwies sich jedoch in seiner Konsistenz als sehr hart. Mikroskopisch zeigte sich der Knorpel gut erhalten in Form und Struktur. Schleimhaut und Submukosa waren nur noch als schmaler Saum erhalten (Abb. 7). Das Implantat wurde in

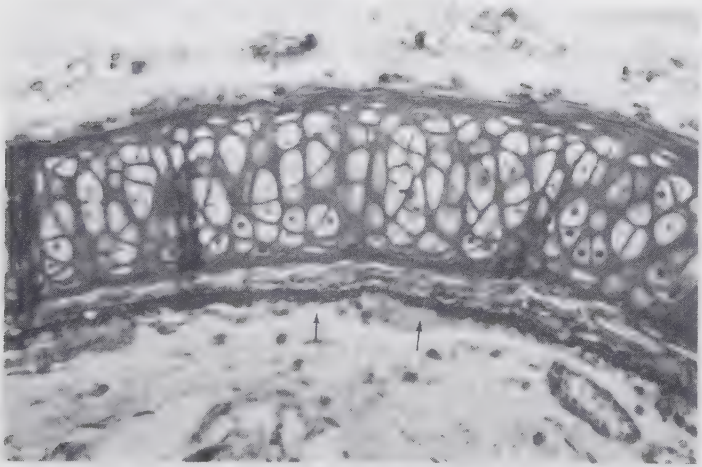


Abb. 7 : Trachealknorpel eines Jungtieres nach 5 Wochen Implantationsdauer. Form und Struktur des Knorpels sind sehr gut erhalten. Schleimhaut und Submukosa (→) sind nur noch als schmaler Saum zu erkennen ; Tri-PAS, 288-fach

analoger Weise mit Chromcat 7-0 eingenäht. Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluß mit Chromcat 3-0.

Von den juvenilen Tieren des zweiten Kollektivs verstarben zwei Tiere zwei Tage nach der intramuskulären Implantation und ein Tier nach zehn Tagen, so daß neun Tiere für die weiteren Versuche zur Verfügung standen. Die Tiere waren sechs Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 65 g erreicht, entsprechend dem Durchschnittsgewicht mitgewachsener und nicht operierter Tiere. Bei einem Tier war das Implantat nicht mehr vorhanden und bei zwei Tieren war das Implantat nicht verwertbar und wurde zur histologischen Aufarbeitung weitergeleitet, so daß sechs Tiere für den Eingriff bereitstanden. Das operative Vorgehen war analog dem der adulten Tiere.

3.7. Histologische Aufarbeitung und Färbungen

Vom ersten Kollektiv wurden je 3 adulte Tiere 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 Tage nach direkter Implantation getötet. Von den juvenilen Tieren starben 8 nach 2, 5, 9 (2), 10, 11 (2) und 15 Tagen. Ein Tier wurde nach 2 Monaten getötet.

Die adulten Tiere des zweiten Kollektivs, bei denen die Implantation in die Trachea nach vorangegangener paratrachealer Implantation erfolgte, wurden 39, 43, 45 und 125 Tage nach dem Eingriff getötet. Von den juvenilen Tieren verstarb eines nach 18 Tagen und zwei Tiere wurden 47 und 70 Tage nach dem Eingriff getötet.

Zur Entnahme der Implantate wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketanest getötet und die Halsregion durch einen medianen Längsschnitt freigelegt. Die Resektion des Implantats erfolgte 1 - 2 Ringe im Gesunden.

Zur Fixierung wurde das Implantat nach der Entnahme sofort in frisch zubereitete Bouin'sche Lösung eingebracht.

15 Teile ges. Pikrinsäure
5 Teile Formalin
1 Teil Eisessig

Bouin'sche Lösung

Nach mindestens einer Woche Fixierungsdauer wurde das Präparat mit 80 %igem Alkohol bis zur Entfärbung ausgewaschen. Anschließend wurde das Material in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom 5 µ dicke Schnitte angefertigt, wobei jeweils 10 Schnitte verworfen und dann drei Schnitte auf drei Objektträger für die drei verschiedenen Färbungen aufgebracht wurden. Nachdem die Schnitte auf die Objektträger montiert und angetrocknet waren, konnten sie gefärbt werden.

Zur besseren Differenzierung der vorhandenen histologischen Strukturen wurden vier verschiedene Färbungen gewählt.

a) HE-Färbung (ROMEIS § 703)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine sogenannte Übersichtsfärbung. Sie enthält den basischen Farbstoff Hämalaun zur Kernfärbung und den sauren Farbstoff Eosin zur Plasmafärbung.

Ergebnisse :	Zellkerne	blau
	Cytoplasma	rot
	Bindegewebe	rot

b) MASSON-GOLDNER-Färbung (ROMEIS § 1540)

Diese Färbemethode gehört zu den Trichromfärbungen, die zur besseren Darstellung des Bindegewebes dienen. Sie enthält den basischen Farbstoff WEIGERT'S Eisenhämatoxylin zur Kernfärbung, Phosphomolybdänsäure-Orange G zur Darstellung von Cytoplasma, Erythro-

cyten und Muskelgewebe und Lichtgrün zur Darstellung von Bindegewebe und Schleim.

Ergebnisse :	Kerne	braunschwarz
	Cytoplasma	schwachorange-rot
	Erythrocyten	leuchtend rot
	Bindegewebe	grün
	Schleim	grau-grün
	Muskelgewebe	blaurot-orange

c) Tri-PAS Färbung (ROMEIS § 2231)

Die einfache PAS-Reaktion nach HOTCHKISS und Mc MANUS beruht nur auf dem Nachweis der Rotfärbung von Kohlenhydraten (z. B. in der Basalmembran) und z. B. Mucoproteiden (z. B. die Mucopolysaccharide des Knorpels).
Als Reagentien dienten dafür Perjodsäure, SCHIFF'sches Reagenz (periodic acid SCHIFF's reaction) und WEIGERT'S Eisenhämatoxylin zur Kernfärbung.
Bei der Tri-PAS Färbung ist die Methode noch um Phosphormolybdänsäure-Orange G zur selektiven Darstellung von Cytoplasma, Erythrocyten und Muskelgewebe erweitert. Um jedoch auch die sauren Mucopolysaccharide des Knorpels darstellen zu können, wurde in diesem Falle die Tri-PAS Färbung mit Alcianblau nach PEARSE durchgeführt.

Ergebnisse :	Knorpel saure MPS	blau-türkis
	bas. MPS	rot
	Kerne	blau-schwarz
	Cytoplasma	gelb-orange
	Erythrocyten	leuchtend rot
	Muskelgewebe	blaßrot-orange

d) KOSSA-Färbung (SELYE)

Diese Färbemethode dient zur Kalkdarstellung. Sie basiert auf der

Versilberung mit Silbernitratlösung. Zusätzlich wurde noch mit Kernechtrot zur Kerndarstellung und Lichtgrün zur Bindegewebedarstellung gefärbt.

Ergebnisse :	Kalk	schwarz
	Kerne	rotviolett
	Bindegewebe	grün

Die histologische Beurteilung der Präparate erfolgte mit dem universellen Großfeldmikroskop "Orthoplan" der Fa. Leitz (Wetzlar). Aufnahmen wurden mit dem Kameraaufsatz "Orthomat" der Fa. Leitz vorgenommen (Farbfilm : Agfa-Chrome 50 L).

3.8. Fluoreszenzmikroskopie

Es gibt in der Literatur zahlreiche Berichte über Versuche histologische Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie darzustellen (DÉHÉRÉ E.(1933), HAITINGER M. (1938), ELLINGER P. (1940) (alle zit. n. PEARSE), STRUGGER S. (1940/49), BRÄUTIGAM F. und A. GRABNER (1949), KRIEG A. (1954/55), MICHEL K. (1962), PLOEM J.S. (1970)). Untersuchungen über Eigenfluoreszenz wurden u.a. beschrieben von POPPER (1940/44), SJÖSTRAND (1944), PIERANGELI E. et al. (1949), RADICE J.C. und S. KAPLAN (1950), HAMA T. und M. OBIKA (1958) (alle zit. n. PEARSE) und außerdem von HAMPERL (1934), HAITINGER (1959) und ROMEIS (1968). Eigenfluoreszenz des Knorpels ist nur in der Grundsubstanz in Form von schwacher hellblauer Fluoreszenz zu beobachten. Kerne und Cytoplasma fluoreszieren nicht (HAMPERL). Da jedoch nur Kerne und Cytoplasma den Vitalitätsgrad einer Zelle belegen können, galt es sich nach bewährten Sekundärfluoreszenzmethoden umzuschauen. Die ersten Versuche, lebende Zellen mittels fluoreszierender Farbstoffe (= Fluorochrome) darzustellen (= Vitalfluorochromierung), wurden von ELLINGER und HIRT (1929) beschrieben. Größere

Bedeutung erlangte die Methode jedoch erst durch das von STRUGGER (1940) erstmals angewandte und beschriebene Acridinorange. Es läßt sich sehr gut als Vitalfluorochromierungsfarbstoff anwenden, da es bereits in sehr niedriger Konzentration Fluoreszenzeffekte erzielt und dabei den Zellstoffwechsel nicht beeinträchtigt. Außerdem ist es als "polychromes Fluorochrom" (STRUGGER) in der Lage, gleichzeitig mehrere Gewebestrukturen anzufärben. Allerdings wurden die Versuche in erster Linie an der Pflanzenzelle entwickelt und beschrieben. Erst 1942 beschrieben STRUGGER und HILBRICH die Vitalfärbung bei Bakterien. Es folgte die Vitalfluorochromierung von Hefezellen (STRUGGER, 1943) und von Ziegenspermatozoen (STRUGGER und ROSENBERGER, 1944).

Erst nach und nach erfolgte die Untersuchung von tierischen, insbesondere von menschlichen Geweben und Zellstrukturen durch Vitalfluorochrome. Dabei sind u.a. zu nennen die Untersuchungen von SCHÜMMELFELDER (1949) über tierische Zellen allgemein, STOCKINGER (1949) über menschliche Spermien, LEONHARDTSBERGER und PAKESCH (1950) über Blutzellen, SCHÜMMELFELDER (1950) über Protoplasma und seine Stoffwechselaktivität, ZEIGER (1951) über Nervengewebe, VINEGAR (1956) über Aszitestumorzellen, WITTEKIND und VÖLCKER (1957) über Erythrocyten und SCHÜMMELFELDER, EBSCHNER und KROGH (1957) über DNS und RNS.

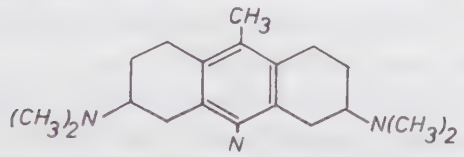
Die Frage nach der Anwendbarkeit der Vitalfluorochromierung mit Acridinorange zur Differenzierung lebender Zellen beim Knorpelgewebe galt es nun in einer Reihe von Vorversuchen zu klären.

Es wurden dabei vitaler und avitaler Knorpel als Vergleichsobjekte herangezogen. Zur Prüfung der Methode wurden verschiedene Konzentrationen, Färbedauern, Farbstoffkombinationen und Filter getestet.

Das Ergebnis bestätigte, daß die Vitalfluorochromierung mit Acridinorange auch beim Knorpel anwendbar ist und sich die bei Pflanzen-

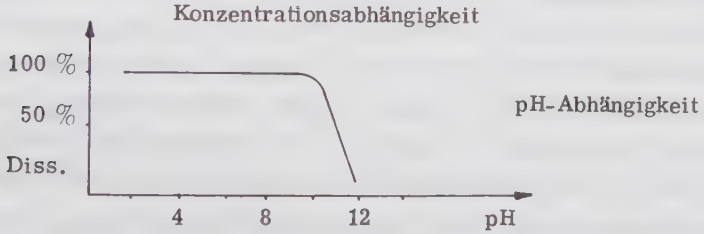
zellen entwickelten Methoden und Ergebnisse in vollem Umfang übertragen lassen.

STRUGGER beschrieb bereits 1940 ausführlich die Versuche mit Acridinorange.



3,6 Tetramethyl-diamino acridin = Acridinorange

1 :	100 000	laubgrün
1 :	10 000	laubgrün
1 :	5 000	gelbgrün
1 :	1 000	gelb
1 :	100	rot



Acridinorange ist ein basischer Farbstoff. Seine Fluoreszenzerscheinungen sind sowohl von der Konzentration als auch vom pH-Wert abhängig. Während Acridinorange bei einer Konzentration von 1 : 10 000 laubgrün fluoresziert, erscheint es bei einer Konzentration von 1 : 100 in roter Fluoreszenz. Man spricht bei diesen Farbveränderungen vom sogenannten "Konzentrationseffekt" (STRUGGER-Effekt).

Letztlich wird dadurch die Unterscheidung von avitaler und vitaler Zelle ermöglicht. Bei der pH-Abhängigkeit ist zu beobachten, daß ab einem pH von 8 bei einer Lösung von 1 : 10 000 die Dissoziation abnimmt und damit auch die Konzentration an Farbstoffmolekülen und

sich somit die laubgrüne Farbe noch verstärkt.
STRUGGER beschreibt, daß sich bei einer Konzentration von 1 : 10 000, einem konstanten pH von 7,8 und einer Färbedauer von 8 Minuten in der vitalen Zelle der Kern gelbgrün und das Cytoplasma grün, in der abgestorbenen Zelle sich der Zellkern zwar auch gelbgrün, das Cytoplasma jedoch kupferrot anfärbt.
Die physikalisch-chemischen Färbevorgänge erklärt er mit der "ausgeprägten Affinität des Acridinorange an den vitalen Eiweißkörpern des Cytoplasmas".
Die Rotfluorochromierung des avitalen Cytoplasmas erklärt er damit, daß in avitalen Zellen eine "Desorganisation der plasmatischen Eiweißmicellarstrukturen" stattfindet und somit mehr Eiweißmoleküle eine größere Oberfläche und damit eine größere Affinität zum Acridinorange aufweisen, was sich letztlich durch den Konzentrationseffekt in der Rotfärbung verdeutlicht. Möglicherweise kann auch der Kernbereich bei vitalen Zellen rötlich leuchten, was jedoch auf optischen Täuschungen oder Überlagerungen gelblich-rötlich fluoreszierender Zellmembranen beruhen kann. Der Beweis ist insofern leicht zu führen, als die Rotfärbung bei vitalen Zellen reversibel ist und mit Blutersatzlösung (z.B. Tyrode, Ringer) ausgewaschen werden kann, bei avitalen Zellen jedoch irreversibel ist (BURCK, 1973).

Bei der Färbung der Präparate ging man folgendermaßen vor :
Nach der Entnahme wurden die Knorpelringe sofort mit flüssigem CO_2 tiefgefroren und mit Kryostaten 7 µ dick geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte auf einem Objektträger montiert und kurz in eine Kuvette mit Phosphatpuffer (pH : 7,8) getaucht. Dann erfolgte die Färbung in einer Kuvette mit reichlich Acridinorange für 8 Minuten. Danach wurde das Acridinorange zweimal mit Phosphatpuffer abgespült und die Schnitte mit Wasser eingedeckt. Glycerin oder Entelan für Dauerfixierungen hatten sich wegen schlechterer photographischer Ergebnisse nicht bewährt. Betrachtet und

photographiert wurde mit einem Zeissmikroskop in Auflichtfluoreszenz.
Als empfohlene Filterkombination wurde der Typ 3 verwendet mit dem Erregerfilter 2 x KP 490 + 1 mm GG 455, dem Dichrom Teilerspiegel T K 310 und dem Sperrfilter K 515.

3.9. Vitalfärbung mit Neutralrot

Um die Vitalität der Knorpelzellen noch sicherer beurteilen zu können, wurde als zweite Vitalfärbemethode die Neutralrotfärbung durchgeführt.
Erste Versuche mit Vitalfarbstoffen gehen auf Paul EHRLICH zurück. Er untersuchte bereits 1894 Sekretions- und Resorptionsvorgänge in der lebenden Zelle mit Neutralrot. SCHMIDT führte zahlreiche Versuche mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau durch. Neuere Untersuchungen mit Neutralrot an Zellorganellen der Ratte liegen von WINCKLER vor.
Eine Reihe von Vorversuchen sollte die beste Methode bestimmen.

Ausgegangen wurde von der Methode von KREDEL und ROBERTS (1935). Sie geben an, daß Knorpelstücke sofort nach der Entnahme in eine Lösung von Neutralrot in Ringerlösung im Verhältnis von 1 : 20 000 eingelegt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden sollen. Modifikationen wurden sowohl in Konzentration, Temperatur, Zeit und pH vorgenommen. Es erwies sich jedoch lediglich eine stärkere Konzentration von 1 : 10 000, wie sie auch von HELLMICH (1974) angegeben wird, als günstiger.

Ebenfalls wurde die Methode von HAGERTY, CALHOON, LEE und CUTTINO (1960) getestet, die eine Lösung von Neutralrot in Tyrodelösung im Verhältnis von 1 : 10 000 und eine Mindestfärbedauer von 48 Stunden vorschreiben. Auch hier wurden Modifikationen in Kon-

zentration, Temperatur, Zeit und pH vorgenommen. Es zeigte sich, daß ein konstanter, leicht saurer pH von 6 - 6,5 unbedingt erforderlich ist und 48 Stunden Färbedauer ausreichend sind.

Nach der Färbung wurden von den Knorpelstücken mit der Rasierklinge möglichst dünne Schnitte hergestellt, auf einen Objektträger mit Ringer- bzw. Tyrodelösung eingedeckt, mit einem Deckglas versehen und anschließend sofort unter dem Mikroskop betrachtet. Um noch dünnere Schnitte zu bekommen, wurde versucht, die Knorpelstücke tiefzufrieren und im Kryostaten zu schneiden. Diese Methode erwies sich jedoch als ungünstig, da der Knorpel im Innern leicht brüchig wurde, somit ein verzerrtes Bild der Knorpelstruktur wiedergab, Zellen sich teilweise herauslösten und so das histologische Bild verfälschten. Diese Schneidemethode kam deshalb für die Neutralrotfärbungsversuche nicht zur Anwendung.

Rote Granula und fehlende Färbung im Kern gelten dabei als Kriterien einer positiven Vitalfärbung. Degenerierende Zellen hingegen zeigen diffuse Cytoplasmafärbungen und orange bis rötliche Tingierungen des Kernes, während avitale Zellen überhaupt keinen Farbstoff annehmen.

Als Vergleichsmöglichkeit zur Beurteilung der Vitalität im Implantat wurde zum einen Trachealknorpel von gesunden, nicht operierten Ratten und zum anderen Trachealknorpel, der mehrere Monate in Cialit lag, verwendet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß beide Methoden qualitativ völlig gleichwertig sind. Jedoch erweist sich die Methode von KREDEL und ROBERTS als günstiger, da sie in kürzerer Zeit durchzuführen ist und der pH-Wert nicht kontrolliert werden muß. So kam letztlich die leicht modifizierte Methode von KREDEL und ROBERTS zur Anwendung, die in folgender Versuchsanordnung empfohlen werden kann :

Der Knorpel wird sofort nach der Entnahme in eine Lösung von Neutralrot in bicarbonatfreie Ringerlösung im Verhältnis von 1 : 10 000 eingelegt und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß gefärbt. Danach werden mit der Rasierklinge möglichst dünne Schnitte angefertigt und mit Ringerlösung auf einem Objektträger eingedeckt. Anschließend sollten die Schnitte möglichst bald unter dem Mikroskop betrachtet werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Direkte Implantation

4.1.1. Makroskopische Beurteilung

Sämtliche Tiere des 1. Kollektivs überstanden den Eingriff zunächst gut. Alle Tiere wiesen einen leichten bis mittleren Stridor auf. Nur bei sechs Tieren der 1. Gruppe und drei Tieren der 2. Gruppe konnte eine leichte Gewichtszunahme festgestellt werden. Je drei der erwachsenen Tiere wurden nach 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 Tagen getötet. Von den Jungtieren starben acht nach 2, 5, 9 (2), 10, 11 (2) und 15 Tagen. Ein einziges Tier überlebte und wurde zwei Monate post operationem getötet.

Die Hälfte der erwachsenen Tiere wiesen bereits makroskopisch leichte bis schwere Entzündungszeichen auf. Bereits nach drei Tagen waren eine Rötung von Muskeln und Tracheaumgebung, unterschiedlich starke Eiteransammlungen im Operationsgebiet und vereinzelt vergrößerte Lymphknoten zu beobachten.

Die Implantate waren allesamt gut adaptiert und mit der Unterlage verbacken. Fadenmaterial war nach zehn Tagen noch voll sichtbar. Eine Nahtinsuffizienz war nur in einigen Fällen zu beobachten. Äußerlich waren nach zehn Tagen noch keine Stenosen sichtbar, jedoch war stellenweise eine Sequestrierung des Implantats festzustellen. Nach dem Aufschneiden der Trachea zeigten sich etwa ab dem fünften Tag innere Stenosierungen, die durch Granulationsgewebe, starke Schleimbildung und gelegentliche entzündliche Schwellungen mit Eiteransammlungen gekennzeichnet waren.

Die Jungtiere, die gestorben waren, boten ähnliche Befunde. In der überwiegenden Zahl war das Lumen fast vollständig stenosiert, was zur Erstickung der Tiere geführt haben dürfte. Eine Ausnahme bildete das Jungtier, das den Eingriff zwei Monate überlebte. Hier waren keine makroskopischen Entzündungszeichen festzustellen. Der Opera-

tionsbereich stellte sich reizlos dar, der Implantatknorpel war deutlich sequestriert und von außen war eine Stenose sichtbar.

4.1.2. Mikroskopische Beurteilung

Bei den Tieren waren folgende zelluläre Reaktionen am Knorpel zu beobachten: Bei den adulten Tieren waren bereits am zweiten Tag post operationem zelluläre Infiltrationen sowohl um den Knorpel herum, als auch in ihn hinein zu beobachten. Dabei fanden sich neben Erythrocyten vor allem Lymphocyten (Abb. 8). Leukocyten und Fibrocyten waren nur vereinzelt zu sehen. Die Infiltrationen begannen sowohl von der Innenseite als auch von der Außenseite rhagadenförmig entlang kleiner Mikroeinrisse oder Verletzungen in den Knorpel einzudringen (Abb. 9).

Etwa ab dem dritten Tag zeigte sich eine zunehmende zelluläre Reaktion in der Umgebung des Fadens. Gleichzeitig sah man, daß der Knorpel an der Nahtstelle komprimiert wurde und dadurch das Perichondrium verletzt war (Abb. 10). Diese Faktoren führten dazu, daß der Knorpel bevorzugt in Fadennähe von reaktiven Infiltraten angegriffen wurde. Bemerkenswert ist, daß auch der angrenzende vitale Knorpel, wenn er verletzt war, im selben Maße wie der implantierte Knorpel von Infiltraten durchsetzt wurde.

In den nächsten Tagen nahmen die zellulären Reaktionen um den Knorpel nur noch mäßig zu. Der Angriff in den Knorpel ging ungehindert weiter. Dabei sah man, daß sich die Infiltrationen lacunenförmig ausbreiteten, den Knorpel sequestrierten und ihn von den traumatisierten Stellen her zu resorbieren begannen.

Ab dem fünften Tage nahmen die Leukocyten zu, wobei die lumenwärts gelegene Knorpelseite stärker befallen war (Abb. 11). Fibrocyten ließen sich vermehrt nachweisen und besonders in Fadennähe waren vereinzelt Makrophagen und Riesenzellen zu sehen.

Abb. 8 : Starke lymphocytäre Infiltration (→) in Schleimhaut und Submukosa bei einem adulten Tier zwei Tage nach direkter Implantation.
HE, 162-fach

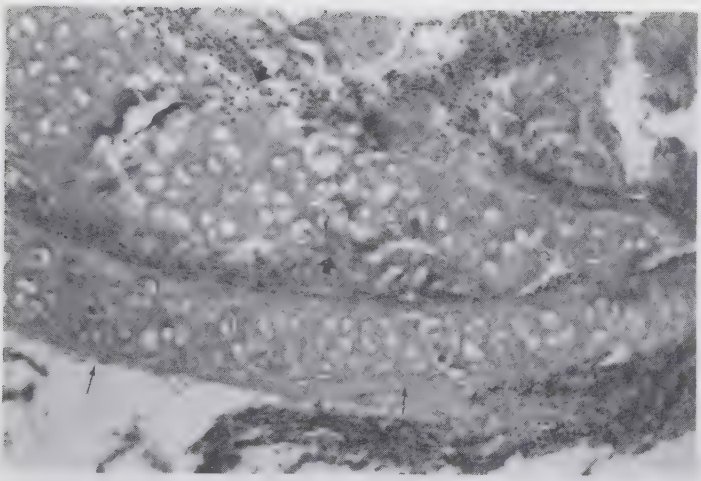


Abb. 9 : Vitaler Knorpel zwei Tage nach direkter Implantation an verletzten Stellen infiltriert und destruiert (➧), daneben intakter Cialitkonservierter Knorpel (→), Tri-PAS, 180-fach

Abb. 10 : Typische mechanische Verletzung im Bereich der Nahtstelle (→) mit Quetschung und Einrissen des Knorpelrings (➡) ; Tri-PAS, 324-fach

Nach einer Woche überwogen die Leukocyten gegenüber den Lymphocyten. Die anastomosennahen Ringe waren stark sequestriert und von den Bruchstellen her massiv infiltriert, destruiert und teilweise schon resorbiert und durch Fibrocyten ersetzt . In diesem Stadium waren auch bereits flächenhafte Infiltrationen entlang des Perichondriums zu finden (Abb. 12,13).

Bei den Jungtieren zeigten sich allgemein die selben Reaktionen, nur nicht so ausgeprägt. So zeigten sich bei der Sektion eines nach zwei Tagen verstorbenen Tieres keine Infiltrationen in den Knorpeln und eines nach neun Tagen gestorbenen Tieres nur eine mäßige Infiltration. Bei dem Jungtier, das zwei Monate den Eingriff überlebt hatte, fanden sich keine entzündlichen Infiltrate mehr. Fibrocyten und Bindegewebseinsprossungen waren nur vereinzelt zu beobachten. Jedoch war der implantierte Knorpel, wie auch der angrenzende gesunde Knorpel, derart sequestriert, daß die Ringform in ihrer Kontinuität nicht mehr erhalten war. In den erhaltenen Partien des korpeligen Ringes war die innere Struktur und Form gut erhalten.

Zur Untersuchung der Vitalität im implantierten Knorpel wurden histologische Färbungen, Vitalfluorochromierungen und Neutralrotfärbungen durchgeführt.

Bei allen Tieren des ersten Kollektivs konnten im Implantatknorpel weder nach zwei Tagen noch nach zwei Monaten vitale Zellen nachgewiesen werden.

Die Problematik, die sich bei den einzelnen Färbemethoden ergab, sei im folgenden erläutert:
Die Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen aufgrund der histologischen Färbungen erwies sich als relativ schwierig, da bereits sicher vitaler Knorpel in den zentralen Bereichen gehäuft Zellen aufwies, die nicht als eindeutig vital zu klassifizieren waren.

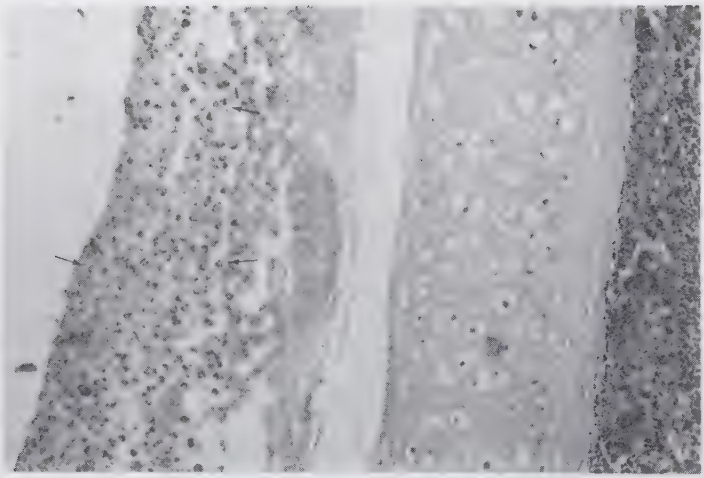


Abb. 11 : Fünf Tage nach direkter Implantation sind lumenwärts (→) vermehrt Leukocyten zu beobachten ; HE, 225-fach

Abb. 12 : Sieben Tage nach direkter Implantation rhagadenförmige und flächenhafte Infiltration in Fadennähe (→) ; Masson-Goldner, 115-fach

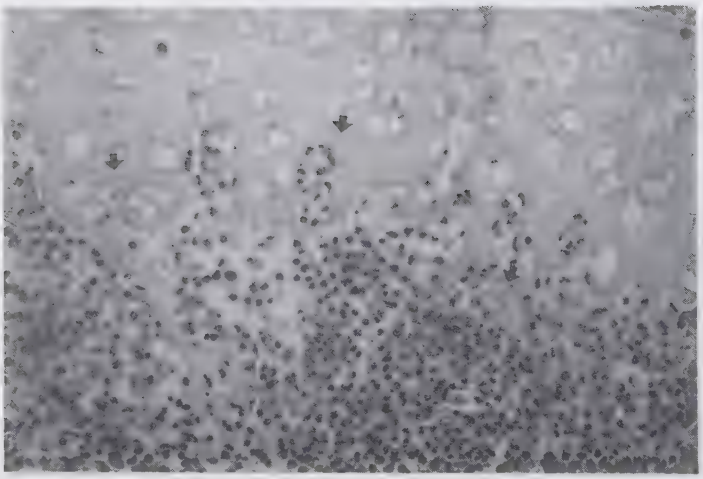


Abb. 13 : Acht Tage nach direkter Implantation großflächige und tiefreichende entzündliche Infiltrate (➧) ;
HE, 288-fach

Die Zellen waren dort oft pyknotisch, entrundet, ohne erkennbare Zellkernmembran und Nukleolus und Zellmembran waren von der Chondrocytenhöhlenwand abgelöst und geschrumpft. Diese Erscheinungen können auf Färbe- und Fixierungseffekte zurückgeführt werden. Ebenso irreführend war, daß sich in cialitkonserviertem Knorpel von Jungtieren nach einer Verweildauer von fünf Monaten noch Kernstrukturen deutlich anfärbten. Jedoch handelte es sich auch hier um Fixierungseffekte. Das Cialit konservierte die Knorpelzellen so gut, daß die abgestorbenen Zellkerne nicht aufgelöst wurden und die Architektur der avitalen Zellen histologisch normal erscheinen konnte (vgl. Abb. 5).

Um nun mit Hilfe der histologischen Färbung die vitalen Zellen sicher verifizieren zu können, wurden folgende Kriterien verwendet:

1. Eine sichere Auswertung war nur in den Perichondrium-nahen Zonen möglich, da nur dort die Zellen gut in ihrer wirklichen Form erhalten waren und eine sichere Beurteilung der Vitalität zuliesen (Abb. 14).
2. Als Kriterien der vitalen Zelle galten:
   - runder Zellkern
   - deutlich sichtbare Zellkernmembran
   - deutlich sichtbarer Nukleulus
   - helle, strukturierte Zellkernsubstanz
   - eine eng an die Chondrocytenhöhlenwand anliegende Zellmembran.

Etwas leichter gestaltete sich die Differenzierung aufgrund der Vitalfärbung mit Acridinorange, wobei auch hier praktische und theoretische Auswertung nicht immer exakt übereinstimmten. Grundsätzlich konnte auch mit dieser Methode die Avitalität und Regenerationsunfähigkeit des implantierten Knorpels bestätigt werden, obwohl nicht alle Zellen, die sicher avital waren, die geforderte

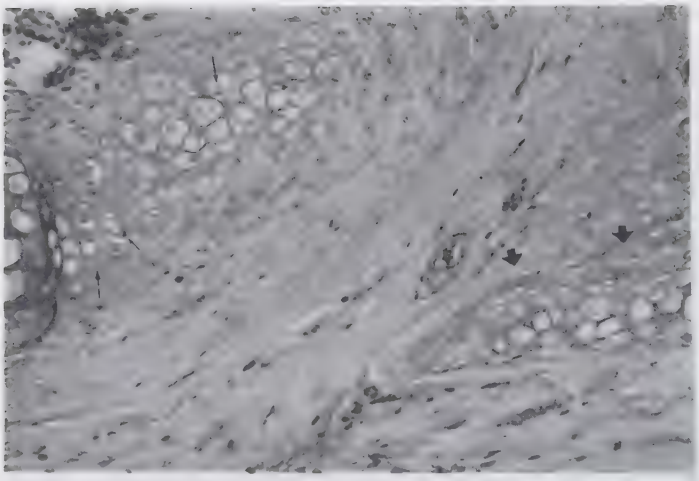


Abb. 14 : In den perichondriumnahen Bereichen lassen sich vitale und avitale Zellen (➧) gut unterscheiden. Die vitalen Zellen sind gut an der Zellkernmembran (→) und dem Nukleolus (→) zu erkennen ; Tri-PAS, 288-fach

Rotfärbung des Cytoplasmas zeigten.
Der Nachweis avitaler Zellen ließ sich einerseits durch Parallelschnitte mit herkömmlicher Färbung und andererseits durch die unterschiedliche Fluoreszenz der Kernstrukturen in diesen Bereichen gegenüber vitalen Zellen erbringen. So wurden folgende Kriterien bei dieser Methode als Maßstab zur Differenzierung herangezogen :

1. Als vitale Zellen galten nur solche, die
   - ein gelbgrünes Cytoplasma,
   - einen gelben Kern und
   - eine stark gelbe Zellkernmembran aufwiesen (Abb. 15, 16).
2. Als avitale galten Zellen, die entweder
   - ein rotes Cytoplasma und einen gelben Kern (Abb. 17), oder
   - nur ein grünliches Cytoplasma ohne deutlichen Kern aufwiesen (Abb. 18, 19, 20).

Am leichtesten gestaltete sich die Differenzierung durch die Neutralrotfärbung. Hier stimmen die Ergebnisse vollkommen mit den theoretischen Überlegungen überein. Im Gegensatz zu den vitalen Zellen mit intracytoplasmatischer roter Granula (Abb. 21), nehmen die Zellen der Implantate keine Rotfärbung an (Abb. 22), was ein sicheres Zeichen für die Avitalität ist (Abb. 23).
Durch diese eindeutigen Ergebnisse bei der Neutralrotfärbung konnten auch die Ergebnisse der histologischen Färbungen und der Vitalfluorochromierung in vollem Umfang bestätigt und die Gültigkeit der angesetzten Kriterien gesichert werden.

Histologische Untersuchungen nach der Implantatentnahme zeigten, daß der Knorpel in seiner inneren Struktur sehr gut erhalten war. Die äußere Form der Knorpelringe war nur in den Bereichen zufriedenstellend erhalten, in denen der Knorpel nicht sequestriert war. Hier spielten mehrere Faktoren, wie Traumatisierung durch

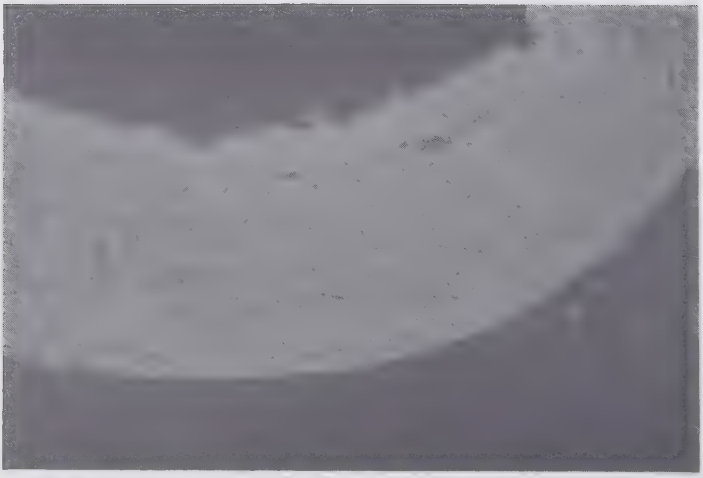


Abb. 15 : Vitale Rattentrachea gefärbt mit Acridinorange. Zeichen der Vitalität sind der gelbe Kern (→) und das gelbgrüne Cytoplasma (→) ; Acridinorange, 115-fach

Abb. 16 : Vitale Knorpelzellen aus der Rattentrachea stark vergrößert ; gelbe Kerne (→) und gelbgrünes Cytoplasma (⟶) als Zeichen der Vitalität ; Acridinorange, 460-fach

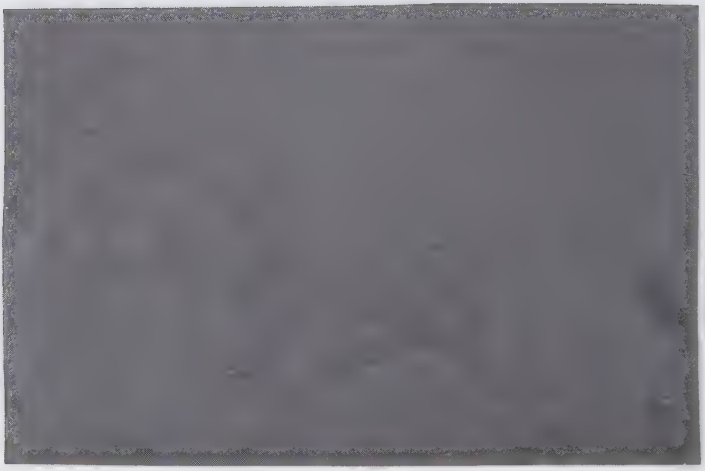


Abb. 17 : Knorpelstück aus dem Implantatbereich eines nach 70 Tagen getöteten Jungtieres des ersten Kollektivs. Typische Rotfärbung des Cytoplasmas (→) als Zeichen der Avitalität ; Acridinorange, 460-fach

Abb. 18 : Cialitkonservierter Trachealknorpel. Als Zeichen der Avitalität zwar keine typische Rotfärbung, jedoch fehlende Kerndarstellungen und dunkelgrünes Cytoplasma (→) ; Acridinorange, eingedeckt in Glycerin, 115-fach

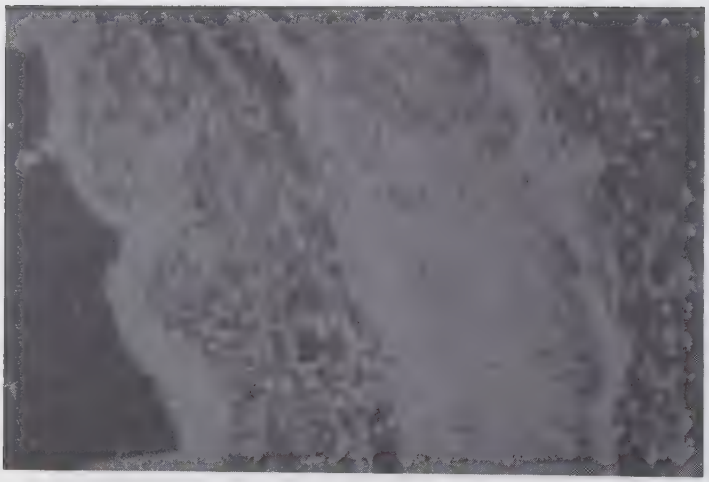


Abb. 19 : Tier wie Abb. 18. Kernlose Chondrocytenhöhlen (→) als Beweis der Avitalität. Verbreiterte Submukosa und vitale Schleimhaut (➧), Acridinorange, 108-fach

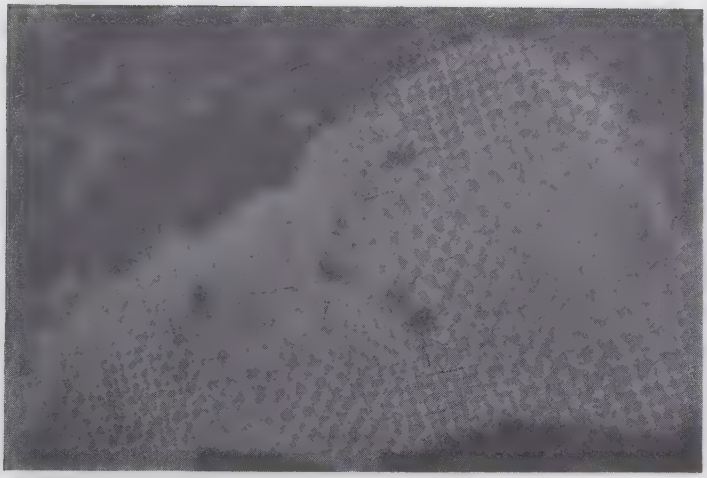


Abb. 20 : Tier wie Abb. 18. Einzelner avitaler Knorpelsequester. Chondrocytenhöhlen (→) sind dunkelgrün bis schwarz, Kernstrukturen (→) färben sich grün an und sind vermehrt und regellos anzufinden ; Acridinorange, 460-fach

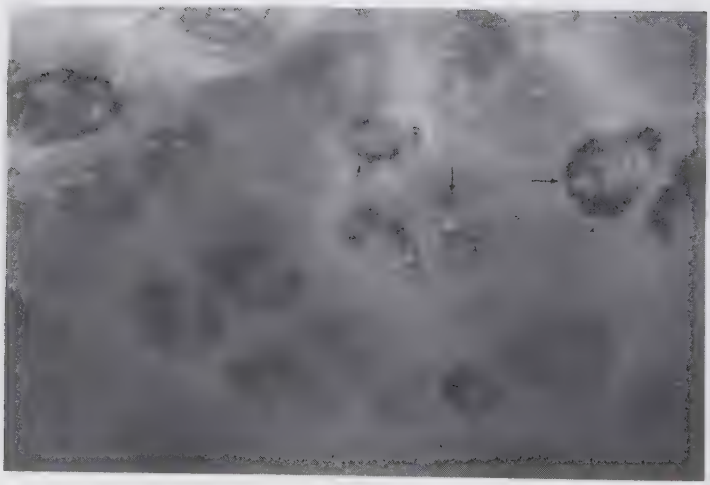


Abb. 21 : Vitale Knorpelzelle angefärbt mit Neutralrot : Im Cytoplasma rote Granula (→), während der Kern ungefärbt bleibt (→) ; Neutralrot 24 Stunden, 1150-fach

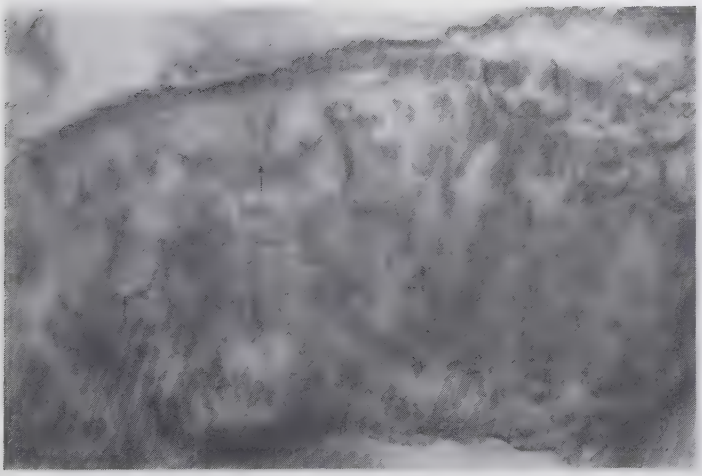


Abb. 22 : Rasierklingenschnitt aus dem Implantatbereich eines nach 125 Tagen getöteten adulten Tieres des zweiten Kollektivs. Es lassen sich keine vitalen Kernstrukturen nachweisen (→) ; Neutralrot, 288-fach

Abb. 23 : Rattentrachealknorpel nach Cialitkonservierung. Keine rote Granula im Cytoplasma nachweisbar (→), was die Avitalität beweist ; Neutralrot, 288-fach

die Nähte, Drehbewegungen des Halses und Schluckbewegungen der Speiseröhre, eine Rolle, die über Mikrotraumen des Knorpels zur Resorption und Substitution durch körpereigenes Bindegewebe führten. Dadurch entstanden in vielen Implantaten Sequestrierungen, die das Formverhalten des ganzen Implantatringes negativ beeinflußten (Abb. 24). Zum ersten Kollektiv sei erwähnt, daß bei den adulten Tieren die Formverluste durch Resorption weitaus stärker und großflächiger waren als bei den juvenilen Tieren.

Um Volumenänderungen der Knorpelimplantate feststellen zu können, wurden vergleichende Messungen unter dem Mikroskop durchgeführt. Als Parameter galt die Knorpelringdicke. Sie zeigte sich in allen Implantaten unverändert, so daß weder eine Schrumpfung, noch eine Vergrößerung festgestellt werden konnte. Unberücksichtigt blieben die resorbierten und durch Bindegewebe substituierten Bereiche.

Bereits nach zwei Tagen war die Submukosa des Implantats leicht ödematös aufgetrieben und von lymphocytären Infiltrationen durchsetzt (Abb. 8). Die alte Schleimhaut war von den Abwehrzellen stark angegriffen und im Abbau begriffen.
Nach drei Tagen war die alte Schleimhaut stellenweise zu 50 % resorbiert. Reaktiv dazu zeigte die gesunde Schleimhaut im Anastomosenbereich Proliferationen in Form von hyperplastischen Auftreibungen (Abb. 25). Nach etwa vier Tagen war das Einsprossen einer ein- bis mehrschichtigen aus kubischen Zellen aufgebauten Ersatzschleimhaut von den Anastomosenrändern in den Implantatbereich zu beobachten (Abb. 26).
Nach fünf Tagen begann das wirtseigene gesunde Flimmerepithel in den Implantatbereich einzuwachsen.
Nach sechs bis acht Tagen waren nur noch Reste alter Schleimhaut nachzuweisen und die Infiltrationen zunehmend leukocytärer Art.
Die Proliferationen der Ersatzschleimhaut waren bevorzugt entlang

Abb. 24 : Starke Stenosierung bei einem juvenilen Tier des ersten Kollektivs, das nach 62 Tagen getötet wurde. Der Knorpel ist sequestriert (→), die Schleimhaut gefältelt (→) und die Submukosa verbreitert (➔) ;
Tri-PAS, 72-fach

Abb. 25 : Schleimhautproliferation mit Fältelung im Anastomosenbereich (→). Bindegewebseinbruch vom paries membranaceus (➧) ; Masson-Goldner, 79-fach

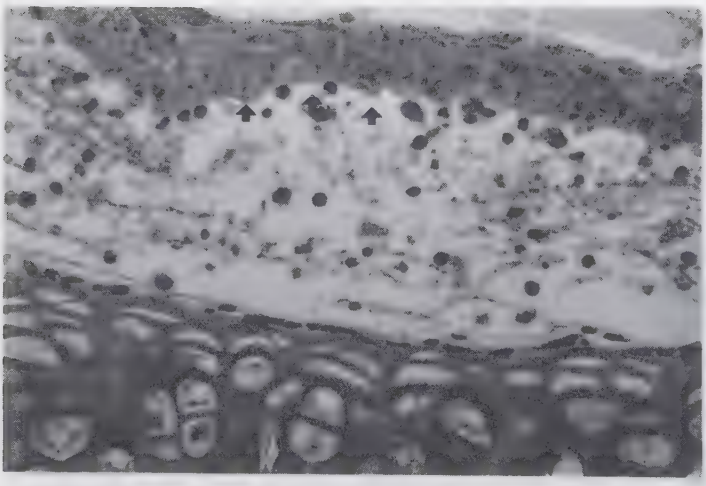


Abb. 26 : Nach acht Tagen ist eine feinschichtige, aus kubischen Zellen aufgebaute, Ersatzschleimhaut im Implantatbereich nachzuweisen (➡) ;
Tri-PAS, 288-fach

dem Fadenmaterial zu beobachten (Abb. 27).
Nach zehn Tagen war keine alte Schleimhaut mehr zu sehen. Die Schleimhautproliferationen des wirtseigenen Flimmerepithels hatten etwa den ersten Implantatknorpelring überdeckt.
Bei dem Jungtier der ersten Versuchsserie, das die Operation überlebt hatte, zeigte sich, daß nach zwei Monaten der Implantatbereich vollkommen mit neuer Schleimhaut überdeckt war. Dabei hatte sich etwa zu dreiviertel vollwertiges und regelrechtes Flimmerepithel mit Flimmerhaaren und Becherzellen gebildet (Abb. 28). Nur in den Bereichen der Nahtstellen, bedingt durch den Fremdkörperreiz, war noch Ersatzschleimhaut vorzufinden. Die Submukosa war breiter als es der Norm entspricht und stark von Fibrocyten und lockerem Bindegewebe durchsetzt (vgl. Abb. 24).

Bei den Tieren des ersten Kollektivs waren in den ersten Tagen noch keine Stenosen nachzuweisen. Erst ab dem fünften Tag waren Einengungen festzustellen. Diese lagen besonders im Anostomosenbereich, bedingt durch die Schleimhauthyperplasien, Wundödeme und Sekretansammlungen (vgl. Abb. 25 u. Abb. 29). Die Stenosierung des Lumens betrug maximal 2/3, so daß 1/3 Restlumen übrigblieb. Die Implantatmitte war abgesehen von Exsudationen und Schleim ohne jegliche Stenosierung.
Anders war es bei dem überlebenden juvenilen Tier. Es hatte nach zwei Monaten eine Stenose aufzuweisen, die das Lumen zwar ebenfalls 2/3 einengte, jedoch am stärksten in der Implantatmitte ausgebildet war (vgl. Abb. 24). Bedingt wurde sie sowohl durch das nicht mitgewachsene Implantat als auch durch die verbreiterte Submukosa.

Abb. 27 : Proliferationen der Ersatzschleimhaut entlang dem Fadenmaterial (→) ;
HE, 115-fach

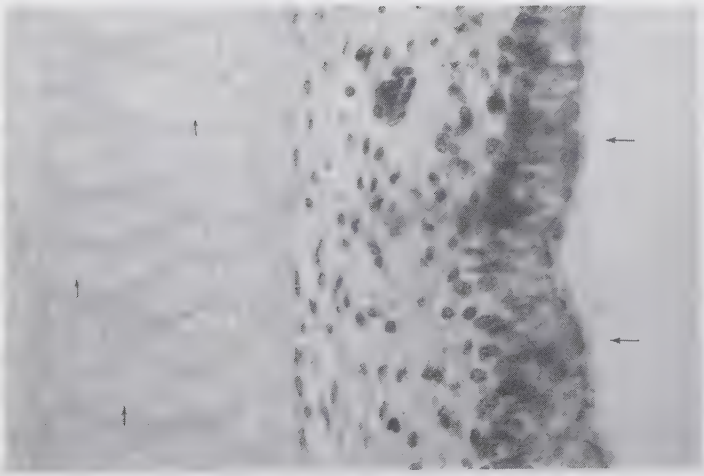


Abb. 28: In stärkerer Vergrößerung kann man das regelrechte Flimmerpithel im Implantatbereich erkennen. Eingesproßtes Flimmerepithel (→), avitaler Cialitknorpel (→) ;
Masson-Goldner, 460-fach

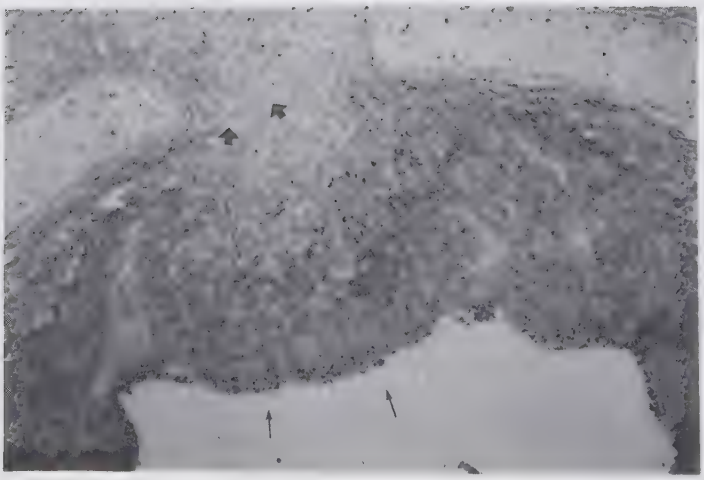


Abb. 29 : Sechs Tage nach direkter Implantation
Bindegewebseinbruch vom paries membranaceus her (➧), dadurch Lumeneinengung (→);
Masson-Goldner, 115-fach

4.2. Implantation nach vorausgegangener paratrachealer Implantation

4.2.1. Makroskopische Beurteilung

Von den vier Tieren der ersten Gruppe erholte sich ein Tier so schnell, daß es bereits nach einer Woche beschwerdefrei war und in der Folgezeit rasch an Gewicht zunahm. Die restlichen drei Tiere erholten sich langsamer, nahmen erst an Gewicht ab und hatten einen starken Stridor. Zwei Tiere erholten sich dann allmählich und hatten nach vier Wochen wieder fast normale Atemgeräusche sowie eine deutliche Gewichtszunahme. Nur ein Tier blieb bis zur Tötung stark stridorös und untergewichtig. Die Tiere wurden nach 39, 43, 45 und 125 Tagen getötet.
Von den drei Tieren der zweiten Gruppe starb ein Tier nach 18 Tagen. Es hatte ständig einen massiven Stridor und an Gewicht verloren. Die anderen beiden Tiere hatten sich beide gut erholt und konstant an Gewicht zugenommen. Jedoch waren sie stets ca. 30 g leichter als nicht operierte Geschwistertiere. Das eine Tier war nach zwei, das andere nach vier Wochen in seiner Atmung beschwerfrei. Die beiden Tiere wurden nach 47 und 70 Tagen getötet.

Alle Tiere zeigten in der Umgebung des Implantats reizlose Gewebeverhältnisse. Fadenreste waren noch vereinzelt zu beobachten. Die Implantate zeigten eine allseitige bindegewebige Umschichtung der Segmente, waren von feinen Gefäßen umgeben, gut adaptiert und fügten sich in die Kontinuität der Trachea ein. Jedoch war schon von außen neben einer meist geringen Stenosebildung eine deutliche Sequestrierung festzustellen (Abb. 30/31). Auch zeigte der Knorpel eine zunehmende Verhärtung. Nach Sektion der Trachea sah man bei allen Tieren eine Stenose, die das Lumen in der Implantatmitte (Abb. 32) teilweise nur geringfügig (Abb. 33), teilweise bis zu 2/3 des Lumens einengte (Abb. 34).

Abb. 30 : Makroskopisch sichtbare Sequestrierungen (→) bei einem adulten Tier des zweiten Kollektivs, das nach 42 Tagen getötet wurde.

Abb. 31 : Makroskopisch sichtbare Sequestrierungen (→) bei einem nach 125 Tagen getöteten adulten Tier des zweiten Kollektivs. In den Implantatbereich von außen eingesproßte Gefäße (→).

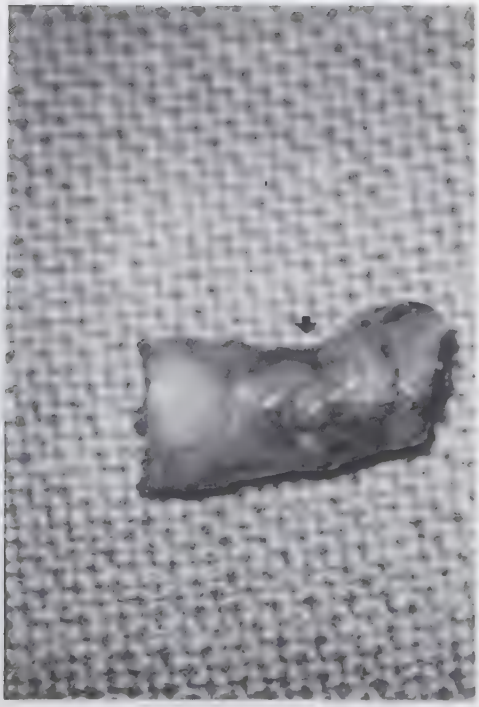


Abb. 32 : Herausgeschnittener Implantatbereich des Tieres von Abb. 31. Sanduhrförmige Lumeneinengung vom paries membranaceus her (➧).

Abb. 33 : Stenose (→) bei einem nach 47 Tagen getöteten juvenilen Tier des zweiten Kollektivs.

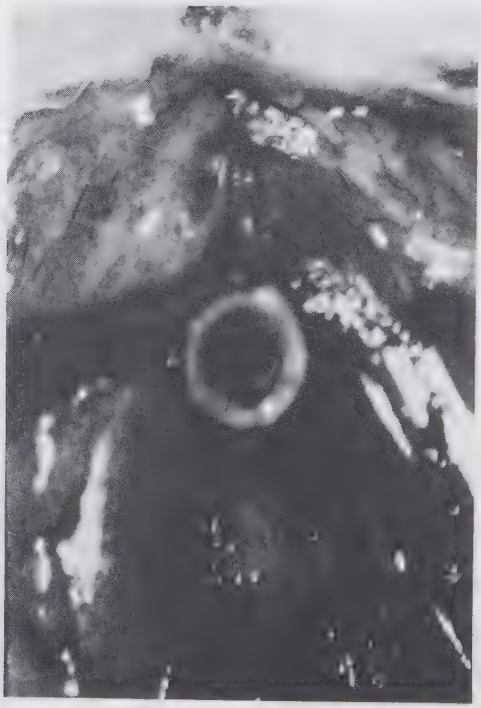


Abb. 34 : Deutlich geringere Stenose (→) bei einem nach 43 Tagen getöteten adulten Tier des zweiten Kollektivs.

4.2.2. Mikroskopische Beurteilung

Die zellulären Reaktionen am Knorpel waren bei jungen und erwachsenen Tieren prinzipiell die gleichen.
Nach 1 - 1 1/2 Monaten fanden sich keine entzündlichen Infiltrate mehr. Alle Knorpelimplantate waren ein- oder mehrmals sequestriert (Abb. 35, vgl. Abb. 45). An den Bruchstellen, die in typischer Weise in der Nähe der Nahtstelle lagen (Abb. 36), waren Fibrocytenansammlungen und lockeres Bindegewebe zu sehen und in den Einbruchzonen waren Gefäße eingesproßt (Abb. 37). Das innere Perichondrium stellte sich in allen Bereichen dünner als das äußere dar und zeigte im Gegensatz zur ersten Versuchsserie quantitativ mehr flächenhafte Traumatisierungen und Bindegewebseinsprossungen (Abb. 38). Auch gesunder Knorpel war an den Nahtstellen angegriffen und großflächig durch lockeres Bindegewebe substituiert (Abb. 39). Anders als der Implantatknorpel zeigt gesunder Knorpel jedoch appositionelles Wachstum als Zeichen der Regeneration. Diese sind in Form von Auftreibungen im Perichondriumbereich mit besonderen Aktivitäten der Knorpelgrundsubstanz zu beobachten.
Nach zwei Monaten konnte man eine geringfügige Verstärkung der resorptiven Vorgänge feststellen. Beim gesunden Knorpel war vermehrt appisitionelles Wachstum zu beobachten. Was sich beim Schneiden des Knorpels schon vermuten ließ, bestätigte die Histologie. Bereits nach zwei Monaten ließ sich im ganzen Implantat gleichmäßig Kalk nachweisen, teils punktförmig intrazellulär, teils großflächig, ganze Chondrone überdeckend.

Auch nach vier Monaten zeigten sich keine wesentlichen neuen Veränderungen. Anastomosennahe Knorpelbereiche waren stark resorbiert und substituiert (Abb. 40, 41), während der Knorpel zur Implantatmitte hin gut in Form und Struktur erhalten war.

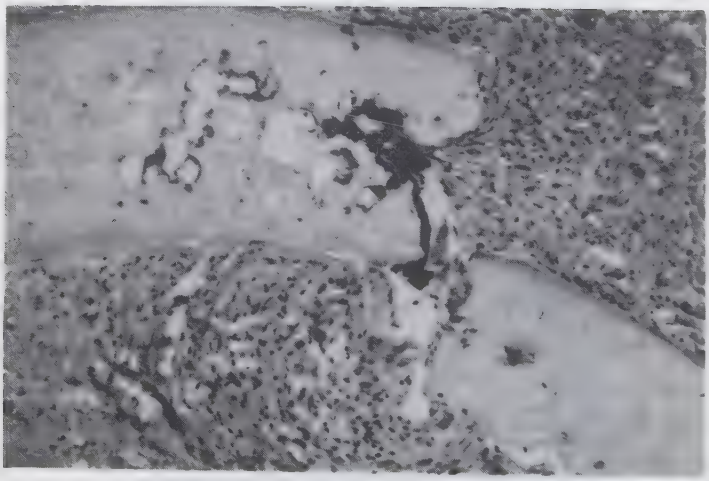


Abb. 35 : Sequestrierung als Endergebnis einer bindegewebigen Infiltration bei einem nach 42 Tagen getöteten adulten Tier ; Masson-Goldner, 180-fach

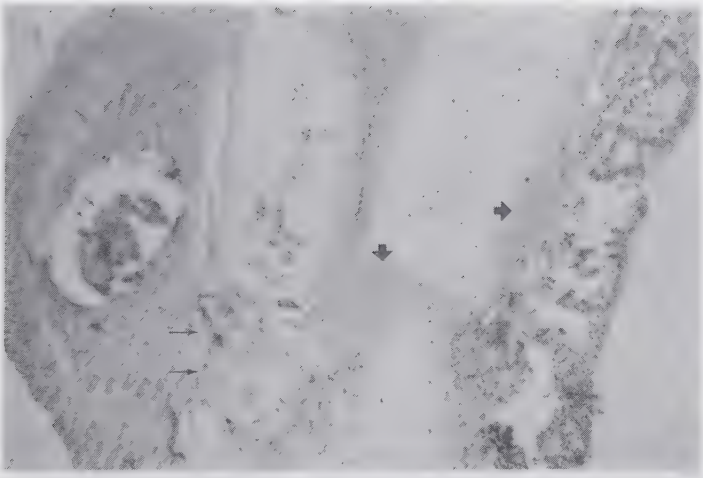


Abb. 36 : Infiltrationen in Fadennähe (→) bei einem nach 39 Tagen getöteten adulten Tier. Während vitaler Knorpel in der Lage ist, sich durch appositionelles Wachstum zu regenerieren (➧), wird der implantierte avitale Knorpel zunehmend resorbiert (→) ;
Masson-Goldner, 90-fach

Abb. 37 : In der Einbruchszone des Sequesters sind eingesproßte Gefäße zu erkennen (→); Tri-PAS, 180-fach

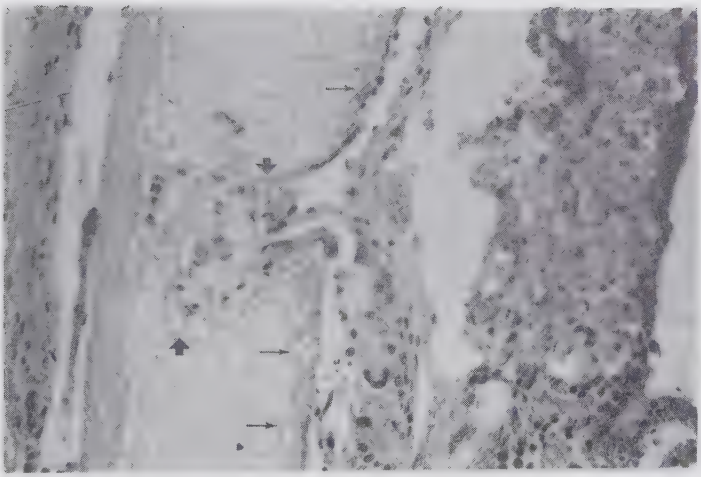


Abb. 38 : Bindegewebseinbruch (➧) bei einem nach 47 Tagen getöteten Jungtier vom inneren Perichondrium (→) her ;
Masson-Goldner, 198-fach

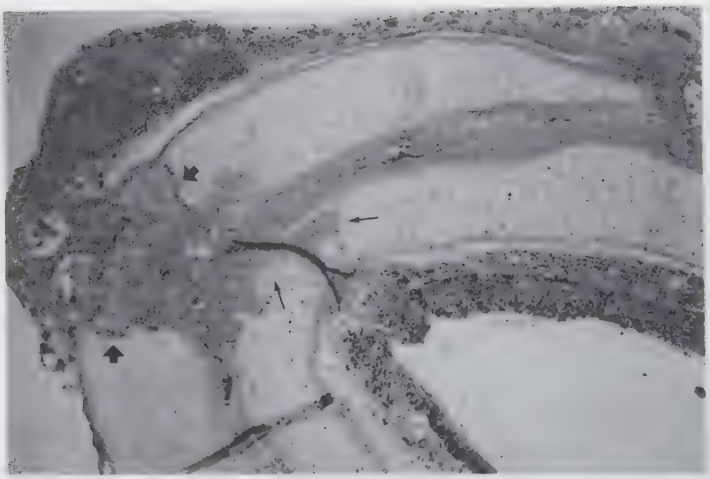


Abb. 39 : Bindegewebseinbruch (➧) bei einem nach 43 Tagen getöteten adulten Tier. Auch vitaler Knorpel (→) wird, wenn er verletzt ist, von Resorptionsvorgängen betroffen ; Masson-Goldner, 72-fach

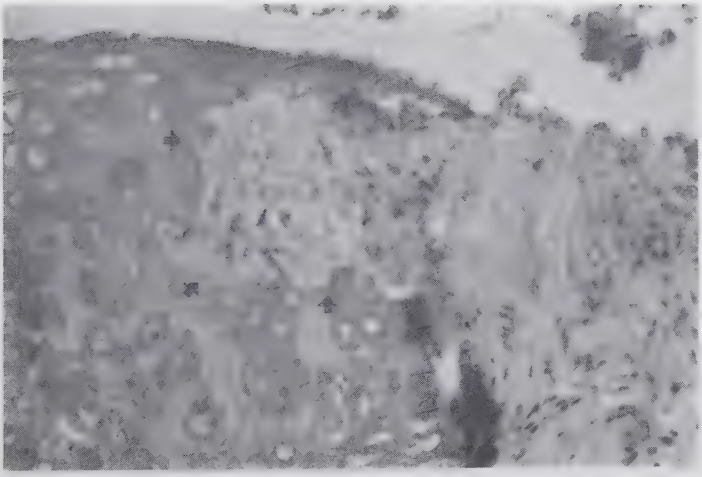


Abb. 40 : Bindegewebseinbruch (➡) bei einem nach 125 Tagen getöteten adulten Tier ; Tri-PAS, 288-fach

Abb. 41 : Abb. 40 zum Vergleich mit Masson-Goldner gefärbt um den Bindegewebsanteil (➧) zu verdeutlichen ;
Masson-Goldner, 288-fach

Die Regeneration des gesunden Knorpels im Anastomosenbereich durch appositionelles Wachstum war ungestört. Auch hier ließ sich in hohem Maße Kalk nachweisen. Im Unterschied zum normalen Knorpel, der nur in den zentralen Feldern Kalk aufweist (Abb. 42), konnte man im Implantatknorpel bis in die Bereiche des Perichondriums Kalk nachweisen (Abb. 43). Die Auswertung dieser Schnitte war erschwert, da der Knorpel, bedingt durch seine Härte, beim Schneiden leicht brach und meist nicht mehr als Ganzes zur Beurteilung vorlage.

Die Prüfung der Vitalität erfolgte mit denselben Färbemethoden wie bei der ersten Versuchsserie (vgl. Abschnitt 4.1.2.). Auch nach vier Monaten waren im Implantatknorpel keine vitalen Zellen nachzuweisen (vgl. Abb. 22).

Bei der Untersuchung von Form, Struktur und Volumen ergaben sich auch hier dieselben Resultate wie bei den Tieren des ersten Kollektivs (vgl. Abschnitt 4.1.2.). Der Knorpel war in seiner inneren Struktur gut erhalten, zeigte jedoch an Stellen, die mechanischen Belastungen ausgesetzt waren, wie z. B. Nahtstellen, ebenfalls Sequestrierungen und Resorptionszonen, so daß an diesen Stellen die Ringform nicht mehr erhalten war. Die Formverluste waren bei dieser Versuchsserie geringer. Vergleichende Untersuchungen des Volumens ergaben auch hier weder Vergrößerungen noch Schrumpfungen des implantierten Knorpels.

Bei allen Tieren der zweiten Versuchsserie zeigte sich, daß neue Schleimhaut bereits nach 1 - 1 1/2 Monaten den Defekt vollständig überbrückte. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt noch in vielen Bereichen kein regelrechtes Flimmerepithel zu finden (Abb. 44). Besonders an den Reizstellen, wie Nahtbereiche, oder an den Stellen starker Granulationsbildung, wie z. B. im Bereich des paries membranaceus, war noch Ersatzschleimhaut zu beobachten.

Abb. 42 : Im vitalen Knorpel zeigen sich nur in den zentralen Bereichen Kalkansammlungen. Der perichondrium-nahe Bereich ist frei von Kalkablagerungen (→); KOSSA, 288-fach

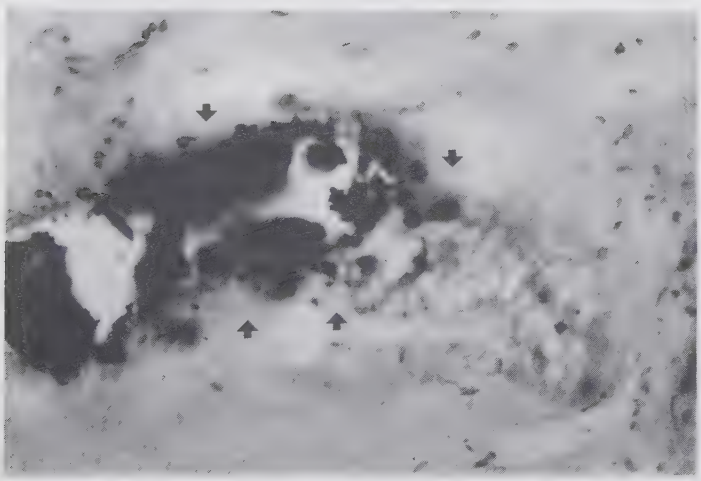


Abb. 43 : Im Implantatbereich eines nach 125 Tagen getöteten adulten Tieres zeigt der Knorpel eine stärkere zentrale Verkalkung und Kalkablagerungen auch in den perichondralen Zonen (➡) ; KOSSA, 360- fach

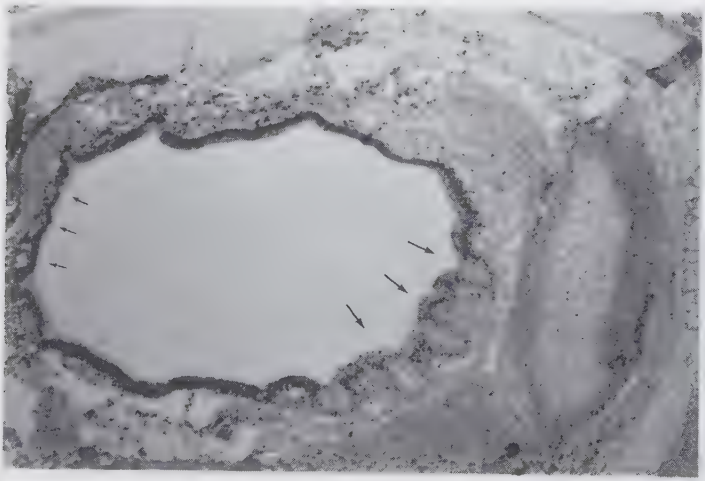


Abb. 44 : Verhalten der Schleimhaut bei einem nach 47 Tagen getöteten Jungtier. Im Anastomosenbereich starke Fältelung und Proliferation (→), angrenzend normales Flimmerepithel und gegenüber am Implantatknorpel noch minderwertiges Epithel (→) ;
Masson-Goldner, 79-fach

In den Anastomosenbereichen bestand noch eine Fältelung der Schleimhaut als Ausdruck der Proliferation (vgl. Abb. 44). Die Submukosa war im Implantatbereich verbreitert, von Fibrocyten, Bindegewebe und gelegentlich von Fettgewebszellen durchsetzt (Abb. 45).
Nach gut zwei Monaten konnte man fast überall vollwertiges Flimmerepithel beobachten.

Die Submukosa war bei den Jungtieren besonders in der Implantatmitte stark verdickt und bindegewebig infiltriert, so daß hier nur noch ein kleines sternförmiges Lumen offenblieb. Nach vier Monaten konnte man im gesamten Implantatbereich regelrechtes Flimmerepithel nachweisen. Jedoch war immer noch eine Fältelung der Schleimhaut sowie eine Verdickung und bindegewebige Infiltration der Submukosa zu beobachten, die besonders stark im Bereich des paries membranaceus ausgebildet war.
Bei den Tieren dieses Kollektivs waren ebenfalls Stenosen mit einer Einengung von mindestens 1/3 bis maximal 2/3 des ursprünglichen Lumens vorzufinden. Bei den adulten Tieren fanden sich die geringeren Stenosierungen, während auch hier die Jungtiere die stärkeren Einengungen aufzuweisen hatten. Neben der verbreiterten Submukosa, mit starker Bindegewebsinfiltration vom paries membranaceus her, ist die durch die Sequestrierung verlorengegangene Stabilität von Bedeutung (vgl. Abb. 44), da hierdurch die Neigung zum Kollabieren des Atemrohrs vergrößert und die Gefahr einer Stenosierung erhöht wurde.

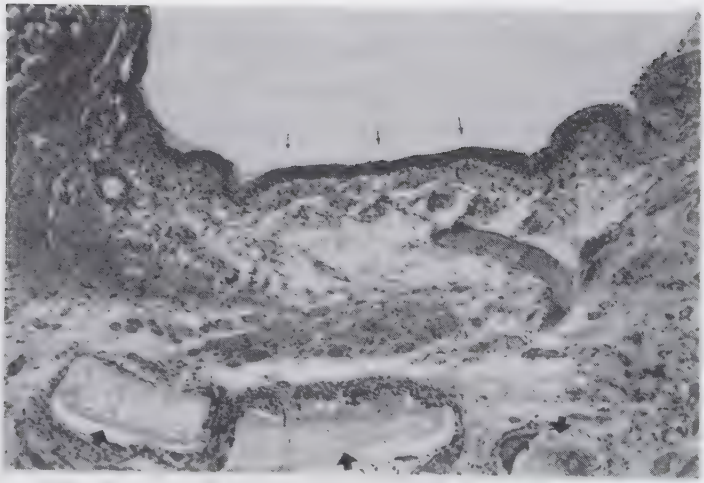


Abb. 45 : Trotz Sequesterbildung (➧) und Destruktionen im Implantatknorpelringbereich ist bei einem nach 47 Tagen getöteten adulten Tier das Flimmerepithel (→) im Implantatbereich größtenteils vollwertig ausgebildet ;
Masson-Goldner, 90-fach

4.3. Zusammenfassung der Befunde

Die Hälfte der adulten Tiere der ersten Versuchsserie zeigte bereits makroskopisch Entzündungszeichen. Äußerlich waren keine Stenosen sichtbar, jedoch konnte man vereinzelt Sequestrierungen des Implantats beobachten. Bereits am zweiten Tag post operationem fanden sich lymphozytäre Infiltrate entlang von Mikroeinrissen im Knorpel. Dabei wurde das in Fadennähe liegende Perichondrium häufiger verletzt und der Knorpel an diesen Stellen stärker angegriffen. In den folgenden Tagen schritten die Infiltrationen lakunenförmig fort, sequestrierten den Knorpel und begannen ihn zu resorbieren und durch Bindegewebe zu substituieren. Ab dem fünften Tag waren vor allem auf der Seite des inneren Perichondriums vermehrt leukozytäre Infiltrationen zu finden.
Bei den Jungtieren zeigten sich im allgemeinen dieselben Ergebnisse. Jedoch waren die zellulären Reaktionen meist schwächer.
Durch die gemeinsame Anwendung von herkömmlicher histologischer Färbung, Vitalfluorochromierung und Neutralrotfärbung konnte nachgewiesen werden, daß weder nach zwei Tagen noch nach zwei Monaten vitale Zellen im Implantatknorpel vorhanden waren.
Die innere Struktur des Knorpels war gut erhalten, jedoch war die natürliche Ringform, bedingt durch die Sequestrierungen meist zerstört.
Volumenveränderungen konnten nicht festgestellt werden.
Die alte Schleimhaut war nach drei Tagen bereits zur Hälfte resorbiert und im Anastomosenbereich waren reaktive Proliferationen zu beobachten. Schon nach vier Tagen zeigte sich das Einsprossen einer ein- bis mehrschichtigen aus kubischen Zellen aufgebauten Ersatzschleimhaut. Nach fünf Tagen war die alte Schleimhaut fast völlig resorbiert und das wirtseigene Flimmerepithel begann in den Implantatbereich einzuwachsen, wobei besonders der Faden als Leitschiene diente. Nach zehn Tagen war der erste Implantatknorpel

von der Schleimhautproliferation überdeckt. Nach zwei Monaten war im Implantatbereich zu etwa 3/4 vollwertiges und regelrechtes Flimmerepithel zu beobachten. Die Submukosa war stark verbreitert und von lockerem Bindegewebe durchsetzt.
Stenosen waren etwa ab dem fünften Tage zu beobachten und lagen besonders im Anastomosenbereich, bedingt durch die Schleimhauthyperplasien, Wundödeme und Sekretansammlungen. Die Einengung betrug maximal 2 3 des Lumens. Das Jungtier zeigte nach zwei Monaten eine Stenosierung von ebenfalls etwa 2/3 des Lumens, die jedoch in der Implantatmitte gelegen war.

Die Tiere der zweiten Versuchsserie erholten sich durchschnittlich besser von der Operation und nahmen schneller an Gewicht zu. Die Implantate waren reizlos eingeheilt, von feinen Gefäßen umgeben und gut adaptiert. Jedoch waren hier schon von außen Stenosen und Sequestrierungen feststellbar. Der Implantatknorpel zeigte sich verhärtet.
Mikroskopisch fanden sich nach 1 1/2 Monaten am Knorpel keine entzündlichen Infiltrationen mehr. Die Sequestrierungen lagen auch hier bevorzugt im Bereich der Nahtstellen und waren von lockerem Bindegewebe ausgefüllt, in das bisweilen Blutgefäße eingesproßt waren. Das innere Perichondrium stellte sich dünner dar und war häufiger traumatisiert und infiltriert. Auch gesunder Knorpel war in der Nähe der Nahtstellen angegriffen und von lockerem Bindegewebe ersetzt. Am gesunden Knorpel war appositionelles Wachstum zu beobachten. Nach zwei Monaten konnte man noch eine leichte Zunahme der resorptiven Vorgänge feststellen.
Im gesamten Implantatknorpel ließ sich gleichmäßig Kalk nachweisen.
Nach vier Monaten zeigten sich keine weiteren Veränderungen. Der Knorpel war im Anastomosenbereich stark resorbiert und substituiert, jedoch in der Implantatmitte noch gut in Form und

Struktur erhalten. Der angegriffene vitale Knorpel war durch appositionelles Wachstum wieder im Aufbau begriffen.
Auch bei den Tieren des zweiten Kollektivs konnten in den Knorpelimplantaten weder nach fünfwöchiger paratrachealer Implantation noch nach anschließender viermonatiger Implantation vitale Knorpelzellen nachgewiesen werden.
Formveränderungen waren hier besonders im Bereich der Sequestrierungen vorzufinden, jedoch in geringerem Maße als in der ersten Versuchsserie.
Volumenänderungen konnten hier nicht festgestellt werden, ebenso wie auch bei den Jungtieren kein Wachstum des Implantatknorpels zu beobachten war.
Das Wachstumsverhalten der Schleimheit entsprach dem der ersten Versuchsserie. Nach zwei Monaten war zwar der Implantatbereich vollständig überdeckt, jedoch nur zum Teil mit vollwertigem Flimmerepithel. Die Submukosa zeigt sich besonders in der Implantatmitte stark verdickt und bindegewebig infiltriert. Nach vier Monaten konnte man überall vollwertiges Flimmerepithel beobachten .
Die Submukosa zeigte sich verbreitert, wobei besonders im Bereich des paries membranaceus starke Bindegewebsinfiltrationen zu beobachten waren.
Bei den adulten Tieren fand sich nur eine geringfügige Stenosierung, während die Jungtiere, bedingt durch das nicht mitwachsende Implantat, regelmäßig eine starke Stenose aufwiesen.

5. DISKUSSION

Die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sollten die Möglichkeiten des Trachealersatzes durch komplette homologe cialitkonservierte Segmentimplantate aufzeigen. Es galt das biologische Verhalten des implantierten Knorpels im Empfängertier, die Schleimhautregeneration im Implantatbereich sowie die Frage nach möglichen Stenosierungen des Tracheallumens zu untersuchen. Besonderes Interesse lag in der eingehenden Untersuchung der Frage der Revitalisierung und der Prüfung der klinischen Anwendbarkeit.

Zur Konservierung wurde das von O'CONNOR und PIERCE eingeführte Cialit verwendet. In Anlehnung an die Methode von PERKINS wurde eine Formolvorfixierung durchgeführt. Die von vielen Autoren (EITSCHBERGER et al., HELLMICH, v. ILBERG et al.) beschriebene gute Qualität der Cialitkonservierung, charakterisiert durch die lange Verwendbarkeit und die Erhaltung von Volumen, Form und Konsistenz, konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In Übereinstimmung mit HELLMICH konnte festgestellt werden, daß die Struktur des Implantatknorpels auch nach Langzeitaufbewahrung so gut erhalten war, daß selbst die Architektur der nicht mehr vitalen Zellen histologisch normal erscheinen kann.

Den Tieren des ersten Kollektivs wurden die Implantate direkt in die Trachea implantiert. Die adulten Tiere wurden nach 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 10 Tagen getötet um die biologischen Frühreaktionen histologisch beurteilen zu können. In den ersten Tagen nach der Operation überwogen in den Zellinfiltrationen um den Implantatknorpel herum deutlich die Lymphocyten, was als Antwort des Organismus auf den Fremdkörperreiz zu deuten ist. Eine Penetration in den Knorpel erfolgte jedoch nur an traumatisierten Stellen.

Dort, wo der Knorpel unverletzt war, zeigte sich das Knorpelgewebe selbst nach vier Monaten noch resistent gegenüber wirtseigenen Abwehrzellen. KASTENBAUER begründet dies in seinen Untersuchungen mit der starken Minderung der Löslichkeit der Proteine aus diesem Gewebe, wodurch möglicherweise eine Antigenminderung, sehr wahrscheinlich aber eine Verzögerung der Antigenfreisetzung bewirkt wird. Zudem beschreiben EITSCHBERGER et al., daß kollagenes Gewebe von seiner festen Substanz her antigenlos ist und die antigenhaltigen Strukturen der Chondrocyten weitgehend durch das Konservierungsmedium zerstört werden, so daß nur eine kleine Restantigenität zurückbleibt. Die dennoch vielerorts zu beobachtende Resorption des Implantatknorpels begründet EITSCHBERGER mit sogenannten Degenerationsherden, die in jedem alternden Knorpel zu finden sind und immer als Orte verringerter Resistenz anzusehen sind. Zudem sind in Gebieten mit größeren mechanischen Belastungen auch vermehrte Resorptionen zu erwarten. In der Halsregion sind es die Drehbewegungen des Halses und die starke Mobilität der Speiseröhre beim Schluckakt die ständige Zug- und Druckkräfte auf den Implantatknorpel ausüben. Letztlich weist er auf die bakterielle Infektion hin, die immer ein schnelleres Einschmelzen des Knorpels bewirkt. Auch WEERDA spricht von der Gefährdung des Implantats durch Infektionen und die starke Mobilität der Trachea im Halsbereich.

Als Zeichen der sekundären bakteriellen Infektion über die Luftwege zeigten sich etwa ab dem fünften Tage auf der Seite des Lumens vermehrt Leukocyten. Da sich das innere Perichondrium, wie auch beim gesunden Vergleichstier, immer dünner darstellt und somit eine geringere mechanische Barriere bildet, erklärt es sich, daß die Infiltrationen von wirtseigenen Abwehrzellen bevorzugt auf der lumennahen Seite des Knorpels nachzuweisen sind.
Ebenso waren Infiltrateinbrüche in hohem Maße in Bereichen zu finden, in denen der Knorpel durch mechanische Läsionen ange-

griffen war. Zweifellos stellt hierbei das Setzen einer Naht eine solche Traumatisierung des Knorpels dar. So ließen sich gerade an den Nahtstellen die ersten Einrisse, Frakturierungen und sekundär die ersten Zellinfiltrationen beobachten.

Von den Bruchstellen ausgehend breiteten sich die Infiltrationen aus wirtseigenem gefäßreichen Granulationsgewebe meist lakunenförmig im Knorpel aus und führten dort zu Sequestrierungen und zur permanenten Knorpelaufzehrung mit nachfolgender Substitution durch narbiges Bindegewebe. Entsprechende Ergebnisse erzielten auch EITSCHBERGER et al. in ihren Untersuchungen über die Implantation merthiolat-konservierter Knorpelspäne in der Rhinoplastik, wobei allogene Rippenknorpelspäne zur Anwendung kamen. Auch v. ILBERG beschreibt bei seinen Untersuchungen mit homologen Trachealimplantaten bei Hunden den Ersatz des Knorpels im Implantat durch eine straffe Bindegewebsnarbe und wies, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, darauf hin, daß ausgedehnte Bindegewebsnarben zu Stabilitätsverlusten der Trachea und damit zu einer Insuffizienz des Atemrohres führen können.

Die paratracheale Vorimplantation, wie sie bei den Tieren des zweiten Kollektivs angewendet wurde, führte zu günstigeren Ergebnissen. Der Knorpel war nach fünfwöchiger Vorimplantation in Form und Struktur völlig intakt und histologisch unverändert nachzuweisen. Dies entspricht auch den Untersuchungsergebnissen von v. ILBERG , der zur Deckung von Trachealknorpelringdefekten bei Kaninchen cialitkonservierte vorimplantierte Knorpelstücke verwendete. Wir konnten zusätzlich noch beobachten, daß der Knorpel von härterer Konsistenz war und eine höhere Brüchigkeit aufzeigte. Wie unsere Untersuchungen ergaben, war dies durch vermehrte Kalkeinlagerungen bedingt. Diese Kalkeinlagerungen schritten auch nach Implantation in die Trachea fort und hatten nach vier Monaten ein beachtliches Ausmaß erreicht. Während altersentsprechender vitaler

Knorpel nur in den zentralen Bereichen Kalk aufweist und die subperichondralen Zonen frei sind, war im Implantat bis in den Perichondriumbereich Kalk nachzuweisen. Das dürfte nur durch eine aktive Kalkeinlagerung zu erklären sein. Dies führt letztlich dazu, daß der Knorpel härter und dadurch seine Stabilität erhöht wird.

In seinem Volumen bleibt der Implantatknorpel konstant, wie vergleichende Messungen mit vitalen Knorpelringen ergeben haben. Dies bestätigt die Untersuchungen von EITSCHBERGER et al., der beschreibt, daß hyaliner Knorpel keinen Schrumpfungen unterliegt, so wie sie etwa beim elastischen Knorpel nachzuweisen sind.

Alle Implantate waren nach paratrachealer Vorimplantation gut von vaskularisiertem Bindegewebe umhüllt, so daß ein Lager für die einwachsende Schleimhaut vorgegeben war. Entsprechend den Beobachtungen von v. ILBERG und WEIDAUER zeigte sich die Einheilung der Implantate in die Trachea reizloser und der postoperative Verlauf komplikationsloser als bei den Tieren des ersten Kollektivs. Die Neigung zum Stridor war geringer, die Gewichtszunahme deutlicher und histologisch waren weniger Resorptionszonen und Bindegewebsnarben nachzuweisen.

Sämtliche Vitalitätsprüfungen ergaben bei unseren Untersuchungen ein negatives Ergebnis. Hier konnten die Ergebnisse von v. ILBERG und WEIDAUER nicht bestätigt werden. Beide Autoren sprechen von einer Revitalisierung des cialitkonservierten Knorpels durch einsprossende Fibroblasten, die die Funktion von Chondroblasten imitieren und so zur Knorpelneubildung führen. Weder eine Regeneration der avitalen Chondrocyten noch ein Einsprossen von Fibroblasten war zu beobachten. Es ließ sich lediglich vereinzelt appositionelles Knorpelwachstum ausgehend vom Perichondrium des benachbarten vitalen Knorpelgewebes nachweisen. Nach unseren Beobachtungen bleibt cialitkonservierter homologer Tracheal-

knorpel nach der Implantation in die Trachea avital und ist nicht zur Revitalisierung fähig.

Das respiratorische Epithel der Trachea ist in der Lage, größere Epitheldefekte problemlos zu überbrücken. Schon nach vier Tagen läßt sich vom Anastomosenrand her das Einwachsen einer feinschichtigen aus kubischen Zellen aufgebauten Ersatzschleimhaut beobachten. Nach etwa zehn Tagen ist bereits ein Ring vollständig überdeckt und nach etwa einem Monat der gesamte Implantatbereich. Nach vier Monaten ist ein großer Teil der Ersatzschleimhaut im Implantatbereich durch regelrechtes Flimmerepithel ersetzt. Die Ergebnisse decken sich mit den von v. ILBERG beschriebenen Versuchen, der eingehend die hohe Regenerationsfähigkeit der Luftröhrenschleimhaut bei Hunden untersucht hat.

Die Submukosa war bei allen Tieren im Implantatbereich verbreitert und stark mit Fibrocyten und lockerem Bindegewebe durchsetzt. Am stärksten zeigte sich die Bindegewebsproliferation im Bereich des paries membranaceus und führte zu Stenosierungen des Lumens mit stärkster Einengung in der Implantatmitte. Stenosen waren bei allen Tieren nachzuweisen. Bei den juvenilen Tieren waren sie am stärksten ausgeprägt, da das nicht mitgewachsene Implantat für sich schon eine Stenose darstellt. Bei den Tieren des ersten Kollektivs waren die Stenosen gehäuft im Bereich der Anastomose zu finden, bedingt durch Wundödeme, Schleimhautproliferationen und Sekretstau. Bei den Tieren des zweiten Kollektivs waren die Stenosen mehr in der Implantatmitte zu finden. Dies war einerseits durch die bereits oben beschriebenen Bindegewebsproliferationen vom paries membranaceus her bedingt. Zum zweiten verminderten die entstandenen Sequester die Stabilität des Implantats und erhöhten die Gefahr des Kollabierens des Atemrohres, was sich dann in der Implantatmitte am stärksten auswirkte.

Was die klinische Anwendbarkeit anbelangt, so ist sie kritisch zu beurteilen. Im Hinblick auf eine langfristige Verweildauer des Implantats sind positiv zu bewerten die gute Einheilung des Implantats nach paratrachealer Vorimplantation, die Beständigkeit von Form und Volumen, die Konsistenzvermehrung durch die Kalkeinlagerung und die hohe Regenerationsfähigkeit des respiratorischen Epithels. Einen ungünstigen Einfluß dürften sowohl die fehlende Revitalisierung des implantierten Knorpels haben als auch die starke Bindegewebsproliferation der Submukosa vom paries membranaceus her, die sich letztlich als Stenosen manifestieren und somit den limitierenden Faktor in der klinischen Anwendbarkeit darstellen. Diese Tatsache begrenzt gleichzeitig auch die Anwendbarkeit an juvenilen Individuen.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von tierexperimentellen Untersuchungen die Möglichkeit des Trachealersatzes durch homologe cialitkonservierte Segmentimplantate aufgezeigt werden. Es wurde das biologische Verhalten des implantierten Knorpels, die Schleimhautregeneration, die Frage nach möglichen Stenosierungen, die Frage der Revitalisierung und die Möglichkeiten der klinischen Anwendbarkeit untersucht. Zwei Tierkollektive wurden für die Versuche gebildet. Beim ersten Kollektiv wurde die direkte Implantation in die Trachea vorgenommen und beim zweiten Kollektiv erst nach einer Vorimplantation in das paratracheale Gewebe.

Zusammenfassend können folgende Feststellungen getroffen werden :

1. Der implantierte Knorpel wird schon bald vom Empfängerorganismus von zellulären Abwehrreaktionen umgeben. Die Antigenität zeigt sich stark vermindert. Unverletzter Knorpel verhält sich auch nach vier Monaten noch resistent gegen wirtseigene Abwehrzellen. Eine Infiltration in den Knorpel findet sich nur an traumatisierten Stellen, wie z. B. im Bereich einer Naht. Dort kommt es rasch zur Resorption des Knorpelgewebes mit nachfolgender Substitution durch körpereigenes gefäßreiches lockeres Bindegewebe und führt sekundär zur Ausbildung von Knorpelsequestern. Auch die starke Mobilität der Speiseröhre, die Drehbewegungen des Halses, die sekundäre bakterielle Infektion der Luftwege und die in jedem alternden Knorpel zu findenden Degenerationsherde begründen die Resorptionen im implantierten Knorpel.

2. Eine paratracheale Vorimplantation für fünf Wochen wird sowohl vom Organismus als auch vom Implantat gut vertragen. Nach anschließender Implantation in die Trachea erfolgt die Einheilung reizloser und der postoperative klinische Verlauf der Tiere zeigt sich günstiger.

3. Cialitkonservierter Knorpel zeigt sich sowohl nach fünfwöchiger Vorimplantation als auch nach viermonatiger Implantation in die Trachea konstant in Form, Struktur und Volumen. Weder Schrumpfungen noch Größenzunahmen sind zu beobachten. Lediglich eine Konsistenzvermehrung durch aktive Kalkeinlagerung ist nachzuweisen und führt zu einer Erhärtung des Knorpels und Erhöhung seiner Stabilität.

4. Sämtliche Vitalitätsprüfungen ergaben bis hin zu einer Verweildauer von vier Monaten ein negatives Ergebnis. Eine Revitalisierung durch einsprossende Fibroblasten, die die Funktion von Chondroblasten imitieren und so zur Knorpelneubildung führen konnte nicht nachgewiesen werden. Es ließ sich lediglich vereinzelt appositionelles Knorpelwachstum, ausgehend vom Perichondrium der benachbarten vitalen Knorpelringe beobachten. Das beweist gleichzeitig, daß kein Wachstum juveniler Segmentimplantate stattfinden kann.

5. Das respiratorische Epithel der Trachea zeigt eine hohe Regenerationsfähigkeit. Schon nach vier Tagen kann man das Einwandern einer feinschichtigen aus kubischen Zellen aufgebauten Ersatzschleimhaut beobachten. Nach zehn Tagen ist bereits der erste Ring überdeckt und nach etwa einem Monat der gesamte Implantatbereich. Nach vier Monaten ist ein großer Teil der Ersatzschleimhaut durch regelrechtes Flimmerepithel mit dazugehörigen Becherzellen ersetzt.

6. Stenosen waren bei allen Tieren in unterschiedlichem Ausmaß zu finden. Bei den juvenilen Tieren wurden sie hauptsächlich durch das nicht mitgewachsene Implantat verursacht. Die Stenosen der adulten Tiere waren in den ersten Tagen durch Wundödeme, Schleimhautproliferationen und Sekretionsstau bedingt und somit im Anastomosenbereich zu finden. Nach längerer Verweildauer der Segmentimplantate finden sich die Stenosen in der Implantatmitte, bedingt durch Verbreiterungen der Submukosa mit starker bindegewebiger Proliferation vom paries membranaceus her und durch Stabilitätsverluste der Knorpelringe durch die Sequestrierungen.

7. Die Prüfung der klinischen Anwendbarkeit ergab folgende Ergebnisse : Einen günstigen Einfluß im Hinblick auf eine langfristige Verweildauer des Segmentimplantats und ein suffizientes Atemrohr haben die gute Einheilung des Implantats nach paratrachealer Vorimplantation, die Beständigkeit von Form, Struktur und Volumen, die Konsistenzvermehrung durch Kalkeinlagerung und die hohe Regenerationsfähigkeit des respiratorischen Epithels. Ungünstigere Voraussetzungen ergeben sich durch die fehlende Revitalisierung des Implantatknorpels und die starke Bindegewebsproliferation der Submukosa besonders vom paries membranaceus her, die sich letztlich als Stenose manifestieren und somit den limitierenden Faktor in der klinischen Anwendbarkeit darstellen.

Die Methode der Implantation cialitkonservierter homologer Trachealsegmente nach vorangegangener paratrachealer Implantation in den Empfängerorganismus zeigt im Tierexperiment einen brauchbaren Weg in der plastisch rekonstruktiven Trachealchirurgie auf.

Cialitkonservierter Knorpel zeigt eine stark verminderte Antigenfreisetzung. Nach paratrachealer Vorimplantation findet eine reiz-

losere Einheilung der Segmentimplantate statt. Eine Infiltration von wirtseigenem Bindegewebe findet nur an traumatisierten Stellen statt, wobei Drehbewegungen des Halses, die Mobilität der Speiseröhre, Traumatisierungen, wie z. B. das Setzen einer Naht und sekundäre bakterielle Infektionen ursächlich zu nennen sind. In den Resorptionszonen kommt es zum bindegewebigen Ersatz und häufig zu Sequesterbildungen mit nachfolgendem Stabilitätsverlust des Atemrohres. Respiratorische Schleimhaut zeigt eine hohe Regenerationsfähigkeit und ist in der Lage nach wenigen Monaten den gesamten Implantatbereich mit vollwertigem Flimmerepithel zu überdecken. Der avitale Implantatknorpel zeigt keine Revitalisierung und ist somit nicht wachstumsfähig, was Eingriffe nur an adulten Tieren möglich macht. Es läßt sich lediglich vereinzelt appositionelles Wachstum, ausgehend vom Perichondrium der vitalen benachbarten Knorpelringe, im Anastomosenbereich nachweisen. Form, Struktur und Volumen der Segmentimplantate bleiben konstant. Durch eine aktive diffuse Kalkeinlagerung erhärtet der implantierte Knorpel und gewinnt an Stabilität. Stenosen lassen sich bei allen Tieren nachweisen. Das morphologische Substrat der Stenosen bilden in erster Linie die Bindegewebsproliferationen im Bereich der Submukosa, die besonders kräftig im Bereich des paries membranaceus ausgeprägt sind. Bedingt durch die Stenosierungen sowie durch die Stabilitätsverluste aufgrund der Sequestrierungen sind die Möglichkeiten in der klinischen Anwendbarkeit limitiert.

7. LITERATURÜBERSICHT

1. ALONSO, W.A., G.P. BRIDGER, J.E. BORDLEY, Tracheal transplantations in dogs. Laryngoscope 82, 204-209 (1972).

2. ATKINS, J.P., Tracheal Reactions Following The Use of Cuffed Tracheotomy Tubes. Ann. Otol. 73, 1124-1129 (1964).

3. BANFAI, J., Chirurgische Beseitigung der durch Knorpeldefekt bedingten Trachealstenose. Z. Laryng., Rhinol. 41, 552-559 (1962).

4. BIRKE, M., S. BIRKE, Erfahrungen zur Äthiologie und Pathomorphologie reanimationsbedingter Kehlkopf- und Trachealstenosen. HNO-Praxis 4/1, 429-432 (1976).

5. BORRIE, J., N.R. REDSHAW, Proesthetic tracheal replacement. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 60, 829-35 (Dez. 1970), Amerika

6. BORRIE, J., N.R. REDSHAW, T.L. DOBBINSON, Silastic tracheal bifurcation prothesis with subterminal Dacron suture cuffs. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 65, Nr. 6, 956-62 (Juni 1973).

7. BRANDT, R.H., Endoprothetik der Luft- und Speisewege. Z.Ekr.Ann. 141, 164-168 (1974).

8. BRÄUTIGAM F. und A. GRABNER, Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie. Wien 1949.

9. BRYCE, D.P., The Surgical Management of laryngotracheal injury. J. Laryngol. Otol. 86, 547-587 (1972).

10. BUKATSCH, F., M. HAITINGER, Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. Protoplasma 34, 515 (1940).

11. BURCK, H.C., Histologische Technik. Thieme, Stuttgart 1973.

12. CHENG, W.F., H. TAKAYI, T. AKUTSU, Prosthetic reconstruction of the trachea. Surgery, 65, Nr. 3, 462-69 (März 1969).

13. EHRLICH, P., Über Neutralroth. Z. wiss. Mikr. 11, 250 Ref. (1894).

14. EITSCHBERGER E., C. GAMMERT, H. MASING, H.J. PESCH, Zur Histomorphologie und Resorption langzeitimplantierter Merthiolatkonservierter Knorpelspäne in der Rhinoplastik. Laryng. Rhinol. 57 (1978).

15. EITSCHBERGER E., C. GAMMERT, W. RICHTER, R. NIEWÖHNER, Über das histologische Verhalten von cialitkonserviertem hyalinem und elastischem Knorpel, implantiert zum Teilersatz der knöchernen Wand der Bulla des Meerschweinchens. Laryng. Rhinol. 56 (1977).

16. EITSCHBERGER, E., W.-D. HEINE, C. GAMMERT, Zur Übertragung von Gehörknöchelchen. Laryng. Rhinol. 56 (1977).

17. ELLINGER, P. und A. HIRT, Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen. I. Mitt. Methodik der Intravitalmikroskopie. Z. Anat. Entw. g. 90, 1929.

18. FLEMMING, J., K.W. HOMMERICH, Trachealstenose. Development and the Latest State of Experimental Surgery. ORL 36, 179-190 (1974).

19. GIBSON, P., Aetiology and repair of tracheal stenosis following tracheostomy and intermittent positive presure respiration. Thorax 22, 1-5 (1967).

20. GOLLMITZ, H., Die Einteilung der Trachealstenosen und ihre operative Behandlung. Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.- und Kehlk. Heilk. 187, 742-746 (Kongreßbericht 1966).

21. GREENBERG, S.D., Tracheal homografts in dogs. Arch. Otolaryng. (Chic.) 67, 577 (1958).

22. GREENE, E., Anatomy of the Rat. Hafner Publishing Co., New York (1955) .

23. GRILLO, H.C., Tracheal Reconstructions. Indications and Techniques. Arch. Otolaryng. 96, 31-39 (1972).

24. HAGERTY, R.F., W.H. LEE, T.B. CALHOON, J.T. CUTTINO, Human cartilage grafts stored in Merthiolate. Surg. Gynec. Obstet. 110, 229-233 (1960).

25. HAITINGER, M., Fluoreszenzmikroskopie. Leipzig 1959.

26. HAMPERL, H., Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. Virchows Arch. path. Anat. u. Physiol. u. Klin. Med. 292 (1934).

27. HAUBERG, G., E. BRUCKSCHEN, Über eine einfache Methode der Knochenkonservierung. Chirurg 25, 6 (1954) 249 .

28. HELLMICH, S., Die Verträglichkeit homoioplastischer Knorpelimplantate in der Nase. Laryng. Rhinol. 49 (1970).

29. HELLMICH, S., Der Einfluß unterschiedlicher Konservierungsmethoden auf die biologische Qualität von Knorpelimplantaten. Laryng. Rhinol. 53 (1974).

30. HELLMICH, S., Die Verpflanzung konservierten Knorpelgewebes. Westdeutscher Verlag Opladen 1974.

31. ILBERG, C.v., S. KITANO, Die Schleimhaut der Trachea nach Intubation. Arch. Ohr.-, Nas.- und Kehlk. Heilkunde 213, 460 (1976).

32. ILBERG, C.v., S. KITANO, A. SCHMIDT, Das Cialit-konservierte Trachealtransplantat. Laryng. Rhinol. 56 (1977).

33. ILBERG, C.v., E. MEYER-BRETING, Das "composite graft" mit cialitkonserviertem Trachealknorpel zur Rekonstruktion der Trachea. Arch. Oto. Rhino. Laryng. 219, 498 (1978).

34. KAPUR, T.R., Tracheal Injury And Reconstruction. Brit. J. Surg. 54, 689-694 (1967).

35. KASTENBAUER, E.R., Tierexperimentelle Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Transplantate im Mittelohr. Immunologische Fragen bei der Tympanoplastik mit Allotransplantaten. Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.-Kehlk. Heilk. 202 (1972).

36. KASTENBAUER, E.R., K. HOCHSTRASSER, Der Einfluß des Konservierungsmittels Cialit auf die Proteinlöslichkeit und die Antigenität von allogenen und xenogenen Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantaten. Arch. klin. exp. Ohr- Nas.- Kehlk. Heilk. 203 (1973).

37. KORNMESSER, H.J., Tierexperimentelle Untersuchungen mit Reimplantation kompletter Trachealsegmente. Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- und Kehlk. Heilkunde 196, 354 (1970).

38. KREDEL und ROBERTS, zitiert bei KRÜGER.

39. KRIEG, A., Eine neue Einrichtung für Fluoreszenzmikroskopie im durch- und auffallenden Licht. Z.w.M. 62 (1954/55).

40. KRÜGER, E., Die Knorpeltransplantation. München 1964.

41. KUP, W., Möglichkeiten und Resultate der Behandlung narbiger Kehlkopf- und Trachealstenosen. HNO-Praxis 4/1, 433-436 (1976).

42. LEONHARDTSBERGER, F., F. PAKESCH, Eigen-, Vital- und Intravitalfluoresnzenz der Blutzellen. Wien. Z. inn. Med. Grenzgebiete 31 (1950).

43. LESOINE, W., Ein Beitrag zur End-zu-End-Anastomose bei Trachealresektionen im cervikalen Bereich. Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- und Kehlk. Heilk. 205, 312-313 (1973).

44. MARQUET, J., Ten years experience in tympanoplasty using homologous implants. J. Laryngol. Otol. 90, 897 (1976).

45. MICHEL, K., Die Mikrophotographie. Springer, Wien 1962.

46. MICHELSON, E., R. SOLOMON, L. MAUN, J. RAMIREZ, Experiments In Tracheal Reconstruction. J. Thorac. Surg. 41, 748-759 (1961).

47. MORITZ, E., Tierexperimentelle Untersuchungen zum alloplastischen Trachealersatz. Wiener klinische Wochenschrift 87. Jg. (1975), Suplementum 45.

48. MORITZ, E., Untersuchungen zum alloplastischen Trachealersatz. Fortschr. Med. 95. Jg. (1977), Nr. 3, 173-176.

49. NORDIN, U., The Trachea and Cuff - Induced Tracheal Injury. An experimental study on causative factors and prevention. Acta Oto-Laryng. 345 (1977).

50. O'CONNOR, G.B., G.W. PIERCE, Refrigerated cartilage isografts. Surg. Gynec. Obstet. 67, 796 (1938).

51. PEARSE, A.G.E., Histochemistry. London 1960.

52. PERKINS, R., Human homograft otologic tissue transplantation buffered formaldehyde preparations. Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 74, 278 (1970).

53. PLOEM, J.S., Standards for Fluorescence Microscopy. Oxford und Edinburgh 1970.

54. RÉVÉSZ, G., G. MIHOK, Die Anwendung einer Kunststoffprothese bei narbiger Stenose des Kehlkopfs und der Trachea. HNO (Berlin) 23, 49-51 (1975).

55. ROB, C., L.L. BROMLEY, Reconstruction of the Trachea. Thorax 8, 269-273 (1953).

56. ROMEIS, B., Mikroskopische Technik. München, Wien 1968.

57. SCHLOSSHAUER, B., Zur Verhütung und Behandlung von Kehlkopf- und Luftröhrenstenosen im Kindesalter. HNO (Berlin) 342-344 (1975).

58. SCHMIDT, W., Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. Z. Zellforsch. 58, 573-637 (1962).

59. SCHÜMMELFELDER, N., Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden, toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. Virchows path. Anat. u. Physiol. u. Klin. Med. 318 (1950).

60. SCHÜMMELFELDER, N., Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Acridinorange,. Naturwiss. 36 (1949).

61. SCHÜMMELFELDER, N., K.I. EBSCHER, E. KROGH, Die Grundlagen der differenten Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonukleinsäure mit Acridinorange. Naturwiss. 44 (1957).

62. SELLING, A., R.M. KONRAD, V. BERNDT, Trachealersatz durch Auto-Alloplastik. Thoraxchirurgie, 19, 27-33 (Febr. 1971), Westdeutschland.

63. SELYE, H., Calciphylaxis. University of Chicago (1962).

64. STEINBACH, E., G. WEBER, Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten von homoioplastischen, in Cialit-konservierten Gehörknöchelchen nach Implantation im Mittelohr des Meerschweinchens. Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- Kehlk. Heilk. 196 (1970).

65. STOCKINGER, L., Über die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung menschlicher Spermien nach Fluorochromierung mit Acridinorange. Mikrosk. 4 (1949).

66. STRUGGER, S., Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jen. Zeitschrift für Nat.wiss. 73 (1940).

67. STRUGGER, S., Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. Flora 137 (1943).

68. STRUGGER, S., Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949.

69. STRUGGER, S. und P. HILBRICH, Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Acridinorangefärbung. Dtsch. tierärztl. Wschr. 50 (1942).

70. STRUGGER, S. und G. ROSENBERGER, Vitalfärbung der Ziegenspermatozoen mit Acridinorange. Dtsch. tierärztl. Wschr. u. Dtsch. tierärztl. Rundschau, 39/40, 52./50. Jahrg. 357.

71. TOOHILL, R.J., D.L. MARTINELLI, M.C. JANOVAC, Repair of laryngeal stenosis with nasal septal grafts. Ann. Otol. (St. Louis) 85, 600 (1976).

72. VINEGAR, R., Metachromatic differential fluorochroming of living and dead Aszites tumor cells with acridin orange. Cancer Res. 16 (1956).

73. WALLER, G., H.J. PESCH, M. WEIDENBECHER, M. NIQUE, Meatoplastik mit allogenem konserviertem Knorpel. Histomorphologische Modellstudie im Tierexperiment. Arch. Oto-Rhino-Laryng. 214 (1976).

74. WEERDA, H., Diskussionsbeitrag im Anschluß an das Referat von WEIDAUER, H., W. ARNOLD: Cialitkonservierte Trachealtransplantate - eine Möglichkeit bei Trachealstenosen? (vgl. Nr. 75).

75. WEIDAUER, H., W. ARNOLD, Cialitkonservierte Trachealtransplantate - eine Möglichkeit bei Trachealstenosen? Arch. f. Ohr.-, Nas.- und Kehlk. Heilk., Bd. 219, S. 497 (1978).

76. WILKE, J., Die endothetische und operative Therapie malazischer und narbiger Trachealstenosen. HNO-Praxis 4/1, 437-444 (1976).

77. WINKLER, J., Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot. Habilitationsschrift, Würzburg (1973)

78. WITTEKIND, D. und A. VÖLCKER, Untersuchungen zur Sekundärfluoreszenz der Erythrozyten. Z. Zellforsch. 45 (1957).

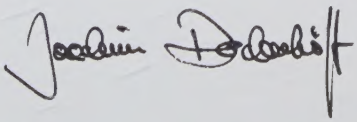
79. ZEIGER, W. und H. HARDES, Über die vitale Fluorochromfärbung des Nervengewebes. Z. Zellforsch. 36 (1951).

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Dr. med. habil. K. Foet für die freundliche Übernahme des Referats und bei Herrn Professor Dr. med. W. Kley für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

LEBENSLAUF

18.9.1954	geboren als Sohn des Günther Dodenhöft und seiner Ehefrau, geb. Klein, in Würzburg.
1960	Eintritt in die Schillerschule Würzburg.
1964	Übertritt in das Röntgen-Gymnasium Würzburg.
8.6.1973	Abschluß der Schulausbildung mit dem Abitur.
1.7.1973 - 15.4.1974	Absolvierung des Wehrdienstes in Veitshöchheim
1.5.1974	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
27.6.1980	Abschluß des Studiums mit Erlangung der Approbation
1.9.1980	Antritt der ersten Stellung als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Juliusspitals Würzburg

Würzburg, den 23. Februar 1981



Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80